

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE
PROF. DR. MED. HANS-J. SCHLITT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**VOM EINFLUSS GENETISCHEN KNOCKOUTS DES INTERFERON- γ -
REZEPTORS UND DER CYCLOOXYGENASE-2 AUF DAS VERHALTEN
MESENCHYMALER STAMMZELLEN IN VITRO**

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER MEDIZIN

AN DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

VORGELEGT VON

HANNAH RIES

2017

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE
PROF. DR. MED. HANS-J. SCHLITT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**VOM EINFLUSS GENETISCHEN KNOCKOUTS DES INTERFERON- γ -
REZEPTORS UND DER CYCLOOXYGENASE-2 AUF DAS VERHALTEN
MESENCHYMALER STAMMZELLEN IN VITRO**

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER MEDIZIN

AN DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

VORGELEGT VON

HANNAH RIES

2017

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Marc-H. Dahlke

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Michael Melter

Tag der mündlichen Prüfung:

01. August 2017

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	- 1 -
1.1. Organtransplantation und Immunsuppression	- 1 -
1.2. Mesenchymale Stammzellen.....	- 2 -
1.2.1. Definition	- 2 -
1.2.2. Vorkommen	- 3 -
1.2.3. Wirkung	- 4 -
1.2.4. MSC und Organtransplantation-Stand aktueller Forschung	- 7 -
1.3. Andere Formen der Zellimmuntherapie	- 9 -
1.4. Ansätze zur Klärung der MSC-Mechanismen.....	- 9 -
1.4.1. Gezielte Genmutation bei Versuchstieren	- 9 -
1.4.2. MSC und Interferon γ	- 10 -
1.4.3. MSC und Prostaglandine.....	- 10 -
1.5. Fragestellung.....	- 11 -
 2. Material und Methoden	- 13 -
2.1. Chemikalien.....	- 13 -
2.2. Antikörper	- 14 -
2.3. Verbrauchsmaterialien.....	- 15 -
2.4. Software	- 15 -
2.5. Geräte	- 16 -
2.6. Tiere und Tierhaltung	- 16 -
2.7. Genotypisierung mittels PCR	- 17 -
2.8. Präparation aus dem Fettgewebe.....	- 17 -
2.9. Kultivierung und Kryokonservierung	- 18 -
2.10. Phänotypisierung.....	- 19 -
2.11. Differenzierung zu Adipozyten und Färbung mit Oil-Red.....	- 19 -
2.12. Differenzierung zu Osteoblasten und Färbung nach von Kossa.....	- 20 -

2.13. Mixed Lymphocyte Reaction (MLR), Mitogen-aktivierte Lymphozyten-Proliferation.....	- 21 -
3. Ergebnisse	- 25 -
3.1. Genotypisierung	- 25 -
3.2. Knockout-ASC sind kultivierbar	- 26 -
3.3. Knockout-ASC besitzen ASC-typische Oberflächenmarker	- 29 -
3.4. Knockout-ASC differenzieren zu Adipozyten und Osteoblasten.....	- 34 -
3.4.1. Differenzierung zu Adipozyten.....	- 34 -
3.4.2. Differenzierung zu Osteoblasten	- 36 -
3.5. Knockout-ASC haben immunsupprimierende Wirkung.....	- 37 -
3.5.1. Immunsuppression durch Wildtyp-ASC	- 38 -
3.5.2. Immunsuppression durch IFN γ -Knockout-ASC	- 39 -
3.5.3. Keine relevante Immunsuppression durch Ptgs2-Knockout-ASC.....	- 41 -
4. Diskussion	- 43 -
4.1. Zellkultur.....	- 43 -
4.2. Phänotypisierung.....	- 44 -
4.3. Differenzierung	- 45 -
4.4. Immunsuppressives Potential.....	- 46 -
4.4.1. Interferon- γ -Knockout-ASC	- 46 -
4.4.2. Ptgs2-Knockout-ASC.....	- 49 -
4.5. Ausblick	- 50 -
5. Zusammenfassung.....	- 52 -
6. Danksagung.....	- 54 -

7. Eidesstattliche Erklärung	- 55 -
---	---------------

8. Literaturverzeichnis	- 56 -
--------------------------------------	---------------

Abkürzungen

APC	Allophycocyanin
ASC	Adipose-tissue derived stromal cell
B6wt	Maus-Stamm C57BL/6J
Balb/c	Maus-Stamm Balb/c
Bp	Basenpaar
CD	cluster of differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl
CFU-C	Colony-forming-unit cell
CFU-F	Colony-forming-units fibroblast
Con A	Concavalin A
COX 2	Cyclooxygenase 2
CsA	Cyclosporin A
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eGFR	Estimated Glomerular Filtration Rate
FACS	Flourescence Activated Cell Sorter
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
GvHD	Graft versus host disease
IFN γ	Interferon γ
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
MiSOT	Mesenchymal Stem Cells in Solid Organ Transplantation
MMF	Mycophenolat Mofetil
MSC	Mesenchymale Stammzelle
NF- κ B	Nukleärer Faktor Kappa B
NK-Zellen	Natural Killer Zellen
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphate buffered Saline
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PI	Propidiumjodid
Ptgs2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2
SC	Splenozyten
SVF	Stromal Vascular Fraction
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α

1. Einleitung

1.1. Organtransplantation und Immunsuppression

Im Jahre 2014 wurden in Deutschland 3488 Organe von verstorbenen Spendern transplantiert, 10.585 Patienten standen am 01.01.2015 aktiv auf der Warteliste [2]. Die Transplantation solider Organe ist notwendig, wenn das körpereigene Organ in seiner Funktion so stark eingeschränkt ist, dass kein langfristiges Überleben möglich ist [3]. Mit einem transplantierten Organ ist der Körper einem fremden Gewebe ausgesetzt, welches sein Immunsystem aktiviert. Akute und chronische Abstoßungsreaktionen sowie Graft-versus-host-disease (GvHD) gefährden das Langzeitüberleben transplanterter Organe [4]. Die hohen Zahlen an Patienten auf der Warteliste von Eurotransplant und die mangelnde Motivation der Bevölkerung selbst Organe zu spenden, machen ein transplantiertes Organ zu einem kostbaren Gut, das durch eine suffiziente und verträgliche Unterdrückung des Immunsystems vor einer Abstoßungsreaktion geschützt werden muss.

Klassischerweise werden zur Immunsuppression nach Organtransplantation verschiedene Medikamente eingesetzt, die auf unterschiedliche Art und Weise die Antwort des Immunsystems unterdrücken [4]. Es muss die Balance zwischen der Unterdrückung der Abstoßung einerseits und der Vermeidung von systemischen Nebenwirkungen wie opportunistischen Infektionen, toxischer Gewebeerstörung und der Entwicklung von Malignomen andererseits gehalten werden [5]. Da die Medikamente lebenslang eingenommen werden müssen, bestehen besonders hohe Anforderungen an ihre Verträglichkeit. Zu Beginn erfolgreicher Transplantationen waren die Möglichkeiten der Immunsuppression auf Glukokortikoide und DNA-Synthesehemmstoffe wie Azathioprin beschränkt [6, 7]. Seit den 1980er Jahren haben sich die Möglichkeiten der medikamentösen Immunsuppression bedeutend weiterentwickelt [7]. Mit den so genannten Biologicals fanden Antikörper den Weg in die Kliniken. Durch die spezifische Bindung an „targets“ sind nebenwirkungsärmere Therapiealternativen verfügbar. So hemmt zum Beispiel Basiliximab, ein rekombinanter chimärer monoklonaler Antikörper, der gegen den Interleukin-2-Rezeptor gerichtet ist, die IL-2 induzierte Zellteilung der T-Lymphozyten [8]. Die Therapie mit klassischen Immunsuppressiva wie zum Beispiel Glukokortikoiden, Cyclosporin A (CsA), Tacrolimus und Mycophenolat-Mofetil (MMF) kann schwerwiegende

Nebenwirkungen mit sich bringen [9]. Diese erschweren die Standardtherapie der Immunsuppression nach einer Organtransplantation. Tabelle 1 fasst die wichtigsten Nebenwirkungen der gängigen Immunsuppressiva nach Organtransplantation zusammen. Chronische Abstoßungsreaktionen können auch mit diesen Substanzen nicht immer verhindert werden [4]. Es besteht demnach ein erheblicher Bedarf an neuen Therapiemöglichkeiten, die langfristige Organakzeptanz bei reduziertem Auftreten schwerwiegender Nebenwirkungen bewerkstelligen zu können.

Substanz	Wirkung	Nebenwirkung
Alle		Opportunistische Infektionen, Reaktivierung viraler Erkrankungen, Tumorentstehung
Calcineurin-Inhibitoren (Cyclosporin A, Tacrolimus)	Hemmung der IL-2-Sekretion	Nephrotoxizität, Hypertonie, Hyperglykämie, Hyperlipidämie
Kortikosteroide	Hemmung der NF-κB-induzierten Expression proinflammatorischer Gene	Hypertonie, Hyperlipidämie, Hyperglykämie, obesitas, Hautveränderungen, uvm
Sirolimus	Hemmung der mTOR-Kinase	Pneumotoxizität, Wundheilungsstörungen, Hyperlipidämie
Mycophenolat-Mofetil	Hemmung der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase	Gastrointestinale Beschwerden

Tabelle 1 Wirkungen und Nebenwirkungen der in der Transplantationsmedizin eingesetzten Immunsuppressiva. Quellen: [7, 10–13] (S. 173, 242, 353-355, 431)

1.2. Mesenchymale Stammzellen

1.2.1. Definition

Friedenstein et al. entdeckten Anfang der 70er Jahre erstmals dem Knochenmark entstammende Zellen, die in der Lage sind bei ausreichender Dichte in einem abgeschlossenen Raum Knochen zu bilden. Er beschrieb diese als Colony forming units fibroblasts (CFU-Fs) im Gegensatz zu den hämatopoietischen Stammzellen, die als Colony forming unit cells (CFU-Cs) beschrieben wurden (Friedenstein et al. 1970). Diese mesenchymalen Stammzellen (MSC) ähneln äußerlich Fibroblasten mit einem kleinen Zellkörper, langen, schmalen Fortsätzen und einem großen

Zellkern und sind an Plastik adhären [14]. Wie alle Stammzellen vermehren sich diese ohne ihre Pluripotenz zu verlieren [6].

In den letzten Jahren haben das Interesse und das Wissen um mesenchymale Stammzellen rasant zugenommen. Aufgrund vielfältiger Forschungsergebnisse zu diesem Thema wird es zunehmend schwieriger, einheitliche Definitionen zu dieser vielversprechenden Zelllinie festzulegen. Die International Society of Cellular Therapy (ISCT) definiert humane mesenchymale Stammzellen nach drei Hauptmerkmalen (Dominici et al. 2006). Demnach sind MSCs

- a) in Zellkultur plastik-adhären und
- b) Zellen, die CD 105, CD 73 und CD 90 exprimieren, während sie für die Oberflächenmarker CD 45, CD 34, CD 14, CD 19, CD 11b und HLA-DR negativ sind sowie
- c) durch in vitro Konfrontation mit bestimmten Reizen in verschiedene Arten des Bindegewebes differenzierbar, darunter Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten.

Trotz dieser Einteilung sind spezifische Marker für mesenchymale Stammzellen, die eine reine Kultur definieren, noch nicht gefunden.

1.2.2. Vorkommen

Nicht nur im Knochenmark, sondern in einer Vielzahl an Organen kommen mesenchymale Stammzellen im Stützgewebe vor [1]. Aufgrund der besseren Zugänglichkeit können multipotente Stammzellen auch aus dem Fettgewebe kultiviert werden [15]. Diese unter anderem Adipose-tissue derived Stromal Cells (ASCs) genannten Zellen aus der Stromal Vascular Fraction (SVF) des Fettgewebes differenzieren ebenso wie ihre Artgenossen aus dem Knochenmark in verschiedene Stützgewebe und exprimieren die klassischen Oberflächenmarker der MSC. Eine Ausnahme bildet das CD 34, ein Molekül, das auf hämatopoietischen Vorläuferzellen vorkommt und die Adhäsion an das Endothel vermittelt [16, 17]. Dieses Antigen wird im Gegensatz zu MSCs auf nativen ASCs gefunden, kann aber wieder verschwinden, wenn die Zellen in Kultur proliferieren [16].

Einen Überblick über das Vorkommen im Stützgewebe verschiedener Organe, die Morphologie sowie die Fähigkeit zur Proliferation in Nestern und das Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen zeigt Abbildung 1.

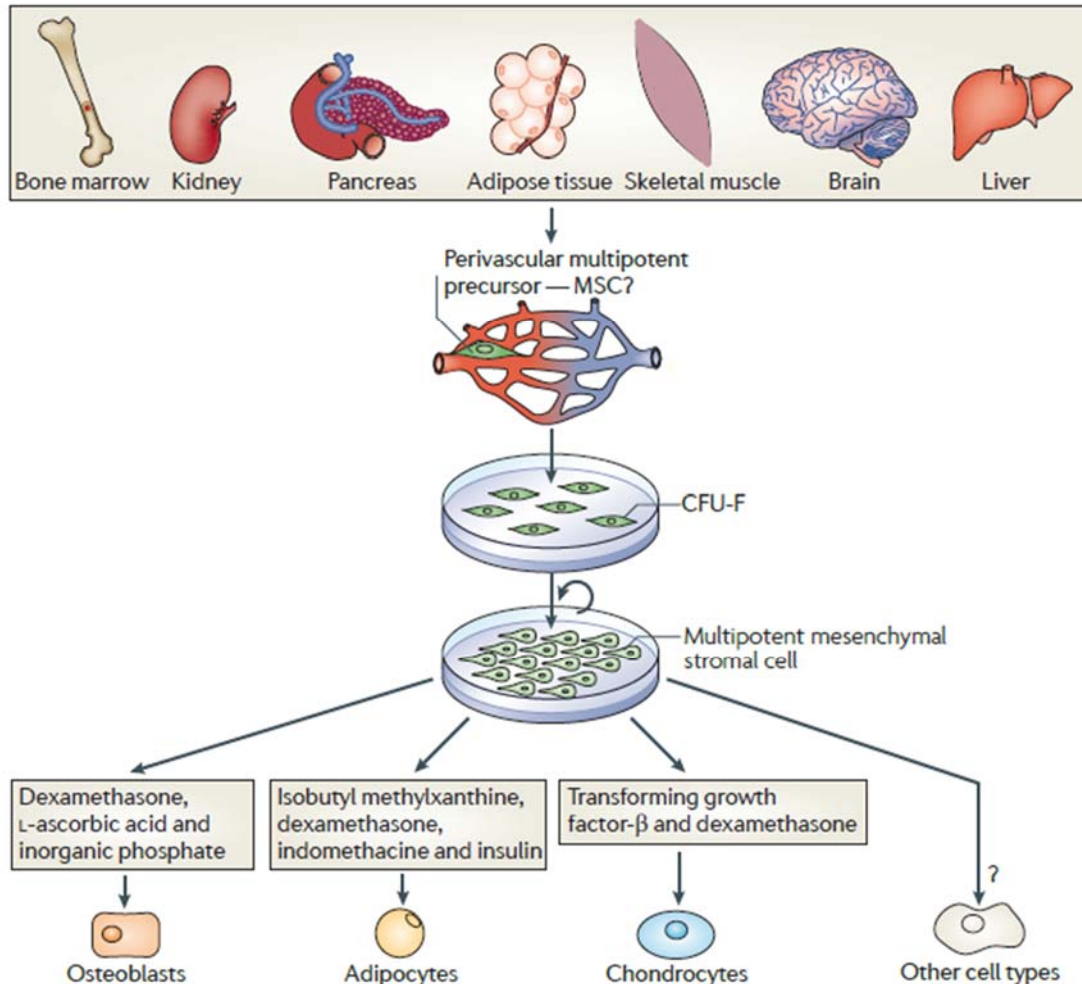


Abbildung 1 Aus den Stützgeweben vieler Organe können Colony-forming-units fibroblasts (CFU-Fs) isoliert werden. Die Morphologie ähnelt jener der Fibroblasten, jedoch entwickeln sich in Zellkultur mesenchymale Stammzellen, die multipotent sind und in verschiedene Gewebe (Fettgewebe, Knochen, Knorpel) differenzieren können. Grafik aus [1], „The elusive nature and function of mesenchymal stem cells“, Nature Reviews Molecular Cell Biology Vol. 12, 2011, S.127

1.2.3. Wirkung

Erst über 30 Jahre nach Entdeckung der mesenchymalen Stammzellen wurde ihre Fähigkeit zur Immunmodulation wahrgenommen [18]. Es konnte nachgewiesen werden, dass MSC in vitro die Lymphozyten-Proliferation verhindern und das Überleben eines Hauttransplantates in vivo verlängern können [19]. Die wertvolle

Fähigkeit, verschiedene Zellen des Immunsystems an ihrer Vermehrung zu hindern, ist seither intensiv erforscht worden.

Das umgebende Milieu ist ein essentieller Faktor für die Wirkung der MSC, die ohne entzündliche Reize ihres Umfelds nicht immunsuppressiv wirken [20]. So wandern intravenös angewendete MSCs in die Lunge ein, nach dem diese durch Bleomycin entzündlich verändert wurde [21]. MSCs werden in vitro von verschiedenen Chemo- und Zytokinen angezogen [18], unter anderem haben Bestandteile des Komplementsystems wie C3a und C5a [22], einige Wachstumsfaktoren wie Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) und Platelet derived Growth Factor AB (PDGF-AB) [23] oder IL-1 β [24] anziehende Wirkung auf mesenchymale Stammzellen. Andere Arbeiten vermuten die Wirkung der MSC aus der Entfernung. Zum Beispiel wiesen Roddy et al, die nach, dass systemisch angewandte MSCs nicht in die Kornea einwandern müssen, um eine immunsupprimierende Wirkung auf die entzündliche Schädigung der Hornhaut auszuüben [25].

Unabhängig davon, ob MSC ihre Wirkung aus der Ferne oder im direkten Kontakt einer Immunantwort ausüben, stellt sich die Frage, durch welche Substanzen sie aktiviert werden. Hierbei spielt IFN γ eine wichtige Rolle, dessen Anwesenheit essentiell ist, um eine Reaktion der MSC auf die Lymphozyten-Proliferation auslösen zu können (siehe auch Kapitel 1.4.2) [26–28]. Außerdem werden im Mausmodell TNF α und IL1 benötigt, um die immunsuppressive Wirkung auszulösen [28]. Eine Mitbeteiligung der Toll-Like-Rezeptor-Signalkaskade wurde ebenfalls nachgewiesen [29].

Nach der Aktivierung können mesenchymale Stammzellen eine Vielzahl an immunmodulierenden Wirkungen zeigen. Zum einen verändern sie die Sekretion von Zytokinen aus Makrophagen und Monozyten. Makrophagen aus septischen Lungen von mit MSC behandelten Mäusen sezernieren vermehrt IL-10 [30], was zu einer Unterdrückung der TH1 und TH2-Zellen führt [17]. Des Weiteren werden T-Zellen direkt von MSCs beeinträchtigt. Es existiert eine unterdrückende Wirkung auf T-Lymphozyten ohne Präferenz eines bestimmten Subtypen, welche die Zellen in einen Zellzyklus-Arrest bringt [31]. Unter dem Einfluss von MSC wird außerdem das Gleichgewicht der CD4-positiven T-Zellen in Richtung TH2-Zellen und damit in eine weniger inflammatorische Richtung verschoben [18]. MSC induzieren unter

entzündlichen Bedingungen die Bildung von T-Zellen eines regulatorischen Phänotyps (Tregs) aus TH17-Zellen [32]. Dies geschieht durch verschiedene Mechanismen: über Zell-Zell-Kontakt via Prostaglandin E2 [33] [32] oder die Adhäsion von TH17-Zellen an MSC via CCR6 [32]. Da T-Lymphozyten eine zentrale Rolle in der Entwicklung einer Abstoßungsreaktion spielen [34], sind die genannten Wirkungen der MSC ein vielversprechender Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Therapiestrategien in der Immunsuppression nach Organtransplantation.

Neben T-Zellen beeinflussen auch B-Lymphozyten das Überleben eines transplantierten Organs [34]. Hier greifen ebenfalls Stammzellen ein: MSC hemmen die Proliferation, die endgültige Differenzierung zur reifen Zelle und die Immunglobulin-Produktion der B-Lymphozyten [35].

Dendritische Zellen (DC) sind antigenpräsentierende Zellen, die T- und B-Lymphozyten aktivieren können [36]. MSC können die Funktion und Reifung dendritischer Zellen aus Monozyten hemmen [37–39]. Dieser Effekt wird über Prostaglandin E2 (PGE2) vermittelt [40]. Darüber hinaus fördern MSC die Bildung regulatorischer DCs. Diese sind weniger immunogen, haben immunregulatorische Wirkungen und eine höhere Endozytose-Aktivität [41]. Außerdem verhindern sie in vitro die Subdifferenzierung von T-Zellen und fördern die Bildung von Tregs [37].

MSCs wirken letztendlich auch auf Natural-Killer-Zellen (NK-Zellen), deren Aktivierung eine Zytolyse maligne entarteter und viral befallener Zellen zur Folge hat [42]. Die durch Zytokine getriggerte Vermehrung der NK-Zellen sowie ihre zytotoxische Wirkung und eigene Zytokin-Produktion werden durch MSC verringert [43].

Den Einfluss mesenchymaler Stammzellen auf die verschiedenen Bestandteile des Immunsystems zeigt Abbildung 2.

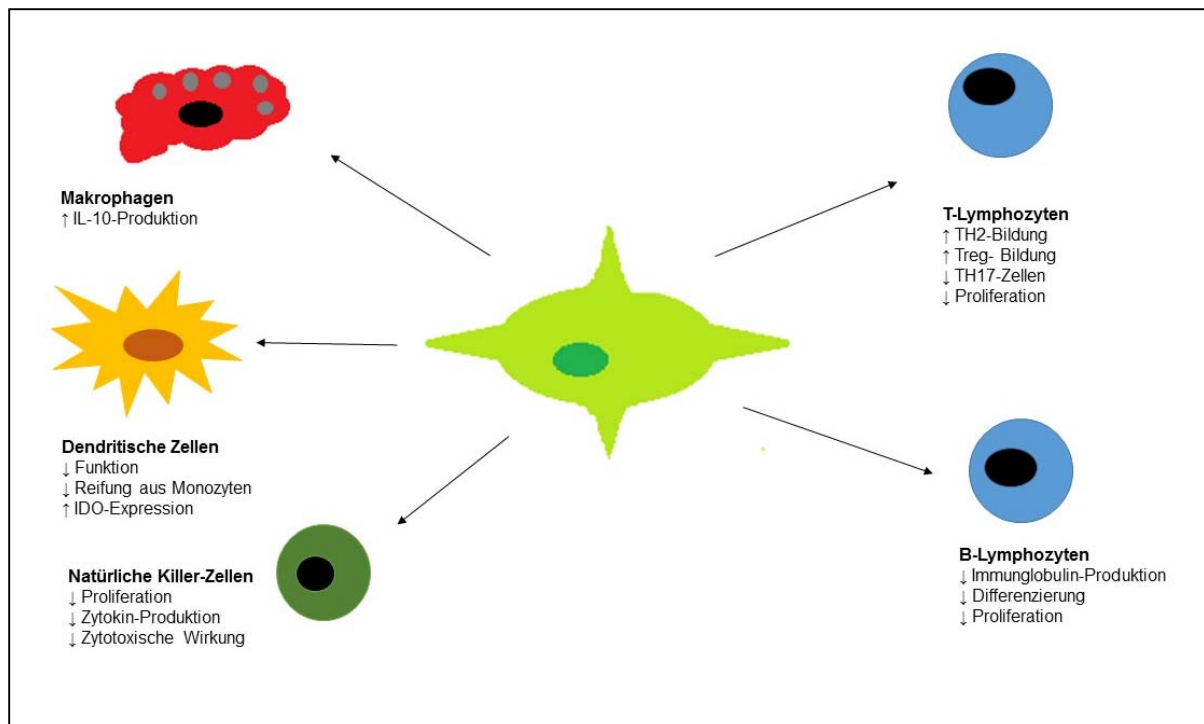


Abbildung 2 Der Einfluss mesenchymaler Stammzellen auf unterschiedliche Zellen des Immunsystems.

1.2.4. MSC und Organtransplantation-Stand aktueller Forschung

Die Wirkung mesenchymaler Stammzellen auf das Immunsystem hat das Interesse internationaler Forschungsgruppen zum Thema Immunsuppression nach Transplantation solider Organe geweckt. In vielen Studien konnte eine Verlängerung des Transplantat-Überlebens durch die Infusion mesenchymaler Stammzellen gezeigt werden, zum Beispiel an einem Haut-Transplantat [19] oder in Kombination mit subtherapeutischen Dosen an Rapamycin in einem Modell der Herztransplantation [44]. Werden MSC in intermittierender Kombination mit niedrig dosiertem Mycophenolat-Mofetil (MMF) gegeben, überleben Herztransplantate im Rattenmodell signifikant länger [45]. Die Kombination mit anderen Immunsuppressiva als Cyclosporin A vermag dies nicht [46], es wurde sogar von einer beschleunigten Abstoßung unter dieser Kombination von Therapien berichtet [47]. Andere Forschungsgruppen fanden einen synergistischen Effekt von CsA und MSC [48].

Die Mehrzahl der Studien stellt mesenchymale Stammzellen als vielversprechende

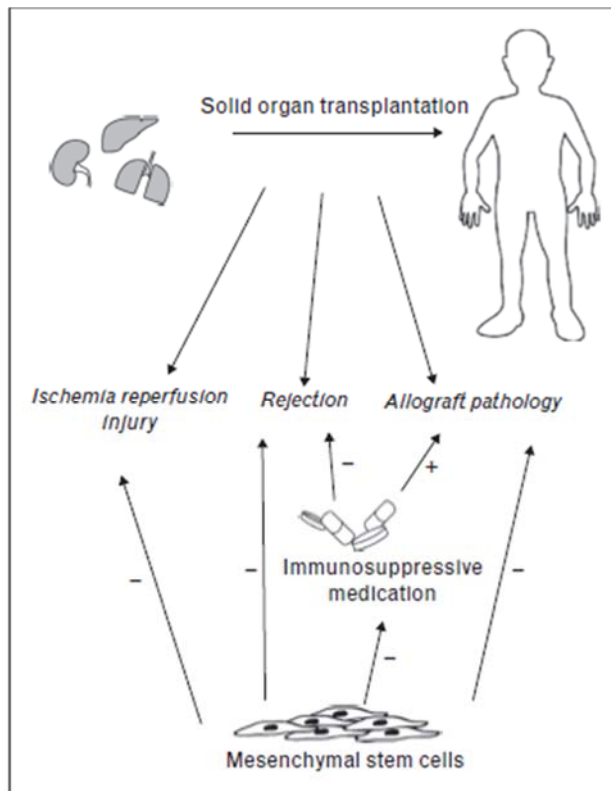


Abbildung 3 Problematik der Organtransplantation und mögliche Therapiealternative zur medikamentösen Immunsuppression durch MSC. Grafik aus Current opinion in Organ transplantation Vol 17, 2012, S. 56 nach Roemeling van Rhijn et al. (Roemeling-van Rhijn et al. 2012)

Möglichkeit zur Behandlung der akuten und chronischen Abstoßung und des Ischämie-Reperfusionsschadens dar [49, 50]. Abbildung 3 zeigt die verschiedenen Therapie-möglichkeiten der MSC in der Transplantationsmedizin. Zur Therapie einer Steroid-refraktären Graft-versus-Host-disease (GvHD) nach Stammzelltransplantation wurden MSC bereits klinisch eingesetzt und zeigten bei über der Hälfte der Patienten eine Verbesserung der GvHD bis zur

kompletten Remission [51]. In diesem Zusammenhang konnten während oder kurz nach der Infusion der Zellen keine

Nebenwirkungen beschrieben werden. Im Vergleich mit anti-IL-2-Antikörpern (Basiliximab, s.o.) bewirken MSC ein Jahr nach Nierentransplantation ein geringeres Vorkommen von sowohl akuten Abstoßungsreaktionen als auch opportunistischen Infektionen und eine bessere Nierenfunktion (eGFR) [52]. Werden MSC beim Verdacht auf eine zelluläre Abstoßung nach Nierentransplantation gegeben, reduzieren sie die interstitielle Entzündungsreaktion im Organ [53].

Um die Anwendung mesenchymaler Stammzellen in der Organtransplantation zwischen den verschiedenen Zentren zu koordinieren wurde 2008 die MiSOT - Forschungsgruppe („Mesenchymal Stem Cells in Solid Organ Transplantation“) gegründet [12]. Auch diese Arbeit wurde im Rahmen der Grundlagenforschung durch MiSOT durchgeführt. Die ersten Phase 1 Studien der MiSOT-Gruppe an leber- oder nierentransplantierten Patienten zeigen Sicherheit und Durchführbarkeit einer intravenösen Therapie mit MSC [53, 54]. Weitere Studien

mit größeren Fallzahlen sind vorgesehen, um Sicherheit und Verträglichkeit der zellulären Therapie mit mesenchymalen Stammzellen zu validieren (www.clinicaltrials.gov).

1.3. Andere Formen der Zellimmuntherapie

Nicht nur in der Organtransplantation müssen immunsuppressive Maßnahmen ergriffen werden, auch andere Erkrankungen sind durch entzündliche Vorgänge charakterisiert. Die zelluläre Immuntherapie ist in vielen Fachdisziplinen auf Interesse gestoßen. MSCs wurden zur Therapie von refraktären perianalen Fisteln bei Morbus Crohn eingesetzt [55] und konnten im Mausmodell die Ausprägung einer experimentell induzierten Autoimmunenzephalitis einschränken [56]. In der Diabetes-Forschung konnten MSC gemeinsam mit Knochenmarkszellen die Funktionstüchtigkeit der Insulin-sezernierenden β -Zellen des Pankreas wiederherstellen und gegen autoreaktive T-Lymphozyten schützen [10]. Es gibt weltweit mehrere Produkte auf MSC-Basis. Ein Beispiel ist *Prochymal*® (*Osiris Therapeutics Inc., USA*), das zur Therapie einer Steroid-refraktären GvHD bei pädiatrischen [57] und erwachsenen Patienten [58] eingesetzt werden kann. Es ist zu erwarten, dass sich der klinische Nutzen der MSC weiter ausweiten wird und in Zukunft auch auf dem europäischen Markt MSC-Therapeutika erhältlich sein werden. Dennoch stellen die Vielfalt an Ursprungsorganen und Kultivierungsprotokollen eine große Herausforderung an ein reproduzierbares Produkt auf MSC-Basis dar [59].

1.4. Ansätze zur Klärung der MSC-Wirkungsmechanismen

Die Mechanismen, durch welche MSC immunmodulierend wirksam sind, sind noch nicht ausreichend verstanden. Um den richtigen Zeitpunkt einer Anwendung von MSC nach Organtransplantationen und die begleitende medikamentöse Therapie festlegen zu können, ist ein genaues Wissen um die beteiligten Faktoren nötig. Die umfangreichen Daten der aktuellen Forschung an mesenchymalen Stammzellen lassen weiterhin Fragen offen, die geklärt werden müssen, um eine systemische Anwendung am transplantierten, immunsupprimierten Patienten zu ermöglichen.

1.4.1. Gezielte Genmutation bei Versuchstieren

Das gezielte Ausschalten von Genmaterial ermöglicht die Erforschung der Funktion des Genproduktes im lebenden Organismus [17]. Es gibt verschiedene Möglichkeiten der genetischen Veränderung. Bei transgenen Tieren wird exogene

DNA mit der gewünschten Veränderung in das Genom eingebracht. Im Gegensatz dazu wird bei gezielten Mutationen die Veränderung des genetischen Materials in embryonalen Stammzellen erwirkt. Diese werden in Host-Blastozysten eingebracht. Es entstehen chimäre Nachkommen, die ihrerseits eine neue Generation gründen. Ist in dieser Generation das Ziel-Gen nicht vorhanden oder funktionslos, heißen die Nachkommen Knock-outs, besitzt sie ein neues oder dupliziertes Gen heißen sie Knock-in Mäuse [60].

1.4.2. MSC und Interferon γ

Interferon- γ (IFN γ) ist ein proinflammatorisches Zytokin, also ein kurz und lokal wirksames Protein, das die Immunantwort aktiviert [17] (S. 71). Es wird von aktivierten TH1-Zellen, zytotoxischen T-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen sezerniert und bewirkt eine Aktivierung der Makrophagen, den Klassenswitch zu Immunglobulin G (IgG) und eine vermehrte MHC-2-Expression [17]. IFN γ spielt aber im Gegensatz zur proinflammatorischen Wirkung eine essentielle Rolle für die Aktivierung der Stammzellen und führt zu einer erhöhten Effizienz der immunsuppressiven Funktion [27, 28, 61]. Es führt zu einer vermehrten Expression der Cyclooxygenase-2 der MSC und damit zu einer erhöhten Prostaglandinsynthese. Außerdem induziert IFN γ bei MSC die funktionelle Indolamin-2,3-Dioxygenase, welche an der durch dendritische Zellen vermittelten Hemmung der T-Zell-Proliferation beteiligt ist [62]. Cyclosporin A senkt die IFN γ -Sekretion der aktivierten Lymphozyten, was Grund für die mangelnde Immunsuppression durch MSC in Kombination mit Cyclosporinen sein kann [46].

Knock-out Mäuse ohne IFN γ -Rezeptor zeigen eine normale T-Zell-Antwort, da kein Einfluss des Knockouts auf die Produktion des Zytokins besteht. Aufgrund ihres Immundefektes leiden sie leichter an Infektionskrankheiten [63]. MSC, die aus Mäusen dieser Linie präpariert werden, dürften nach bisherigem Wissenstand nicht in der Lage sein, immunsupprimierend zu wirken, da sie nicht ausreichend aktiviert werden können.

1.4.3. MSC und Prostaglandine

Die Herstellung von Prostaglandinen erfolgt aus Arachidonsäure über das Enzym Prostaglandin-Endoperoxid Synthase [64], das durch das Ptgs-Gen kodiert wird und heutzutage besser als Cyclooxygenase (COX) bekannt ist. Dieses Enzym besitzt eine Cyclooxygenase- und eine Peroxidase-Aktivität. Es kommt im

menschlichen Gewebe in zwei Isoformen vor: die COX-1 wird konstitutiv exprimiert und ist in den meisten menschlichen Zellen vorhanden, während die COX-2 im Gewebe durch entzündliche Reize induzierbar ist [65]. Prostaglandine wirken in der Umgebung ihrer Freisetzung und haben unterschiedliche, gewebespezifische Wirkungen, wie unter anderem die lokale Vasodilatation, welche die Nierenperfusion reguliert oder der Schutz der Magenschleimhaut durch erhöhte Bikarbonatsekretion [64]. Im Immunsystem modulieren sie die Lymphozyten-Reaktion [66] indem sie die Proliferation und Zytokin-Produktion regulieren sowie Apoptose der Immunzellen induzieren können [67].

Mesenchymale Stammzellen exprimieren die COX-1 und die COX-2 konstitutiv [62]. Diese produzieren Prostaglandin E₂ (PGE₂), welches vermehrt sezerniert wird, wenn die MSC sich in Kultur mit Lymphozyten befinden [66]. Fügt man einer solchen Kultur einen COX-Inhibitor hinzu, hebt dies die Immunsuppression auf [66]. PGE₂ wirkt außerdem mit bei der Hemmung der Transformation zu TH17-Lymphozyten [33] und bei der Umprogrammierung von Makrophagen im Modell der Sepsis [30]. MSC von Ptgs2-Knockout-Mäusen können keinen Anstieg des antiinflammatorischen IL-10 durch Makrophagen in diesem Modell auslösen [30]. Weiterhin fehlt diesen MSC die Fähigkeit zur Hemmung der Degranulation und Zytokinausschüttung von Mastzellen [68].

Knockout-Mäuse ohne das Ptgs2-Gen besitzen keine Cyclooxygenase-Aktivität bei erhaltener Funktion der Peroxidase. Sie neigen zur Entwicklung von Thrombosen und leiden ab einem Alter von 3 Monaten an erhöhtem Blutdruck. Die Nieren sind klein und blass, haben einen schmalen Rindenbereich und zeigen eine interstitielle Entzündung [69]. Weitere Auswirkungen der fehlenden immunmodulierenden Prostaglandine sind nicht beschrieben. Es stellt sich die Frage, ob Ptgs2-Knockout-MSC immunsupprimierend wirksam sein können.

1.5. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurden die mesenchymalen Stammzellen von Mäusen des Stammes C57BL/6J mit gentechnisch veränderten Tieren desselben Stammes verglichen. Die gentechnische Veränderung wird bewirkt durch ein Nichtvorhandensein des IFN γ -Rezeptors beziehungsweise der Cyclooxygenase-Funktion der COX2. Dies ermöglicht die Analyse der Auswirkung von Interferon γ und Prostaglandinen auf die Funktion der Stammzellen. Aufgrund der besseren

Zugänglichkeit wurden diese aus dem Fettgewebe präpariert. Diese Arbeit soll die folgenden Fragen beantworten:

Unterscheiden sich die Eigenschaften und die immunsuppressive Wirkung mesenchymaler Stammzellen aus dem Fettgewebe, wenn die Gene für die Cyclooxygenase 2 und den IFN γ -Rezeptor gentechnisch ausgeschaltet sind?

1. Lassen sich Knockout-ASC kultivieren?
2. Welche Oberflächenmarker kommen auf Knockout-ASC vor?
3. Differenzieren Knockout-ASC genauso wie Wildtyp-ASC?
4. Wie immunsuppressiv wirken Knockout-ASC im Vergleich zu Wildtyp-ASC?

Durch Beantworten dieser Fragen können Rückschlüsse auf den molekularen Weg der Funktion der Stammzellen geschlossen werden.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich, USA
2-Mercaptoethanol	Gibco Life technologies, USA
3-Isobutyl, 1-Methylxanthin	Sigma-Aldrich, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	Biomol, Hamburg
Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE)	Invitrogen, USA
Concavalin A 1 µg/µl	Sigma-Aldrich, USA
Dexamethason water soluble	Sigma-Aldrich, USA
Dimethyl Sulphoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich, USA
Dulbecco's phosphate buffered saline 500 ml	Sigma-Aldrich, USA
Dynabeads Mouse T-Activator CD 3/CD 28	Gibco Life technologies, USA
Erythrocyte Lysis Buffer	Quiagen GmbH, Niederlande
FcR-Blocking Reagent	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Fetal Bovine Serum	Sigma-Aldrich, USA
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt
HEPES-Puffer (ph 7,36-7,39/NaOH)	Sigma-Aldrich, USA
Humaninsulin Normal 100 IE/ml	Lilly Deutschland, Bad Homburg
Indomethacin minimum 99% TLC	Sigma-Aldrich, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kollagenase Typ 4, 250 U/ml CLS 4	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ
L-Ascorbic Acid 99+%	Sigma-Aldrich, USA
L-Glutamin 200 mM	Sigma-Aldrich, USA
MEM Vitamin Solution	Sigma-Aldrich, USA
MEM-non essential Amino-Acids	Gibco Life technologies, USA
Minimum Essential Medium Eagle Alpha	Sigma-Aldrich, USA
Na-Pyruvat Solution	Gibco Life technologies, USA
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich, USA
Oil-Red O	Sigma-Aldrich, USA
Penicillin 10 000 U/Streptomycin 10 mg	Sigma-Aldrich, USA

peqGOLD 100 bp DNA-Leiter

peqlab Biotechnologie

GmbH, Erlangen

peqGOLD Universal Agarose,

peqLab Biotechnologie

GmbH, Erlangen

Platinum Blue PCR SuperMix

Invitrogen, USA

PCR-Primer (oIMR7834 Forward PTGS2,

Sigma-Aldrich, USA

oIMR7835 reverse PTGS2)

PCR-Primer (oIMR0587infgr1 1, oIMR0588

Sigma-Aldrich, USA

infgr1 2, oIMR6916infgr1 3, oIMR6917infgr1 4)

2.2. Antikörper

Tabelle 2 zeigt die Antikörper, die für die Bestimmung des Immunphänotyps sowie zur Auswertung der Mitogen-induzierten Lymphozyten-Proliferation verwendet wurden.

Antikörper	Hersteller	Clone	Spezies
CD 8a-APC	eBioscience	53-6.7	Maus
CD 4-APC	BD Pharmingen	RM4-5	Maus
CD 11c-APC	eBioscience	N418	Maus
CD 29-APC	eBioscience	eBioHmb1-1	Maus/Ratte
CD 31-APC	eBioscience	390	Maus
CD 19-APC	BD Pharmingen	1D3	Maus
CD 44-APC	BD Pharmingen	IM7	Maus
CD 90.1-APC	eBioscience	HIS51	Maus/Ratte
IgG 2a-APC	eBioscience	eBr2a	Maus
CD 34-FITC	BD Pharmingen	RAM 34	Maus
CD 106-FITC	eBioscience	429	Maus
Sca-1-FITC	Miltenyi Biotech	D7	Maus
PD-1-FITC	eBioscience	J43	Maus
H2Kb-FITC	Becton Dickinson	AF6-88.5	Maus
H2Kd-FITC	BD Pharmingen	SF1-1.1	Maus
IgG 2b-FITC	BD Pharmingen	A95-1	Ratte
CD 3e-PE	eBioscience	145-2C11	Maus
CD 4-PE	BD Pharmingen	H129.19	Ratte
CD 117-PE	Becton Dickinson	c-Kit 2B8	Maus

CD 105-PE	eBioscience	MJ7/18	Maus
CD 73-PE	BD Pharmingen	TY/23	Maus
CD 11b-PE	eBioscience	M1/70	Ratte
CD 45R-PE	Miltenyi Biotech	B220	Maus
MHC2-PE	eBioscience	NIMR-4	Maus
IgG 1-PE	eBioscience	eBRG1	Ratte

Tabelle 2 Antikörper zur Bestimmung des Immunphänotyps der mesenchymalen Stammzellen sowie zur Auswertung der Lymphozyten-Proliferation.

2.3. Verbrauchsmaterialien

Cell Culture Dish 100x20 mm	Corning Inc., USA
Cellstar Tubes 50 ml, 15 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Costar Reagent Reservoir 50 ml	Corning Inc., USA
FACS-Tubes 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Nadeln 27 G	Becton Dickinson, USA
Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml, Aspiration	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen 10 µl	Star Lab Products, UK
Pipettenspitzen 100-1000 µl	Corning Inc., USA
Spritzen 2 ml, 5 ml, 10 ml	Becton Dickinson, USA
Well-Platten 6 well, 12 well:	Becton Dickinson, USA
Well-Platten 96 well	Corning Inc., USA
Zellkulturflaschen 175 cm ² , 75 cm ²	Corning Inc., USA
Zellkulturflaschen 70 ml	Becton Dickinson, USA
Zellsiebe 40 µm, 100 µm	Corning Inc., USA

2.4. Software

Axio Vision Rel. 4.8	Zeiss
Citavi 4	Swiss Academic Software, Schweiz
Flow Jo 7.5	Tree Star Inc. USA
Microsoft Paint, Picture Manager, Word, PowerPoint, Excel 2007/2013	Microsoft Corporation USA
SPSS 21	IBM SPSS Statistics, USA

2.5. Geräte

Analysewaage LC210	Labor Center Nürnberg
Anatomische Pinzette	Aeskulap, Tuttlingen
Axio-Observer Z1 mit Axio Cam ICc3	Zeiss, Jena, Deutschland
Biohazard Clean Air DIN 12950 BS 5726	Telstar Laboratory Equipment, Niederlande
Certomat Rüttler	Sartorius AG, Göttingen
FACS Calibur Durchflusszytometer	Becton Dickinson, USA
Fisher Bioblock Scientific Top Mix 11118	Illkirch-Graffenstaden, Frankreich
Heraeus 6000 Thermo Fisher Scientific (37°C, 5% CO ₂)	Hanau, Deutschland
Julabo Wasserbad SW-20C	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Leitz DM-IL Lichtmikroskop	Leica Mikroskopie GmbH, Wetzlar
Neubauer Zählkammer	Sarstedt, Nümbrecht
Peltier Thermal Cycler 200	MJ Research, St. Bruno, Canada
Pipetten 1000µl, 500µl, 200 µl, 100 µl, 50 µl, 20 µl, 10 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Präparierschere	Aeskulap, Tuttlingen
RCT Basic Magnetrührer	IKA Werke, Staufen
Thermo Scientific Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg

2.6. Tiere und Tierhaltung

Die für die Versuche verwendeten Mäuse waren zum Zeitpunkt der Ankunft an der Universitätsklinik Regensburg 4 Wochen alt. Die art- und verhaltensgerechte Haltung erfolgte im Tierstall D4 und H4 der Forschung des Universitätsklinikums Regensburg unter Standardbedingungen nach den Empfehlungen der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS). Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Nahrung. Im Alter von etwa 8 Wochen wurden die Tiere für Versuche verwendet. Die Isolierung der ASC erfolgte aus dem Fettgewebe der Tiere des Stammes C57BL/6J sowohl des Wildtyp-Stammes als auch der

Knockout-Tiere. Balb/c-Splenozyten wurden als responder für die Mitogen-induzierte Lymphozyten-Proliferation verwendet. Tabelle 3 zeigt die Herkunft der Tiere und die veränderten Allele der Knockouts.

Name	Stamm	Verändertes Allel	Referenz
B6 Wildtyp	C57BL/6J	--	The Jackson Laboratory, USA
B6-IFNγ-/-	C57BL/6J	B6.129S7- <i>Ifng</i> ^{tm1Agt/J}	The Jackson Laboratory, USA
B6-Ptgs2-/-	C57BL/6J	B6.129S6(FVB)- <i>Ptgs2</i> ^{tm1.1Fun/J}	The Jackson Laboratory, USA
Balb/c	AnNCrl	--	Charles River, USA

Tabelle 3 Genetischer Hintergrund und Bezug der verschiedenen Maus-Stämme mit Bezeichnung des genetisch veränderten Allels bei den IFN γ - und Ptgs2-Knockout-Mäusen

2.7. Genotypisierung mittels PCR

Im Alter von 4 Wochen wurde die Genetik der Knockout Mäuse überprüft. Hierfür wurden Schwanzproben der Tiere entnommen, die über Nacht mit Proteinase K inkubierten. Am nächsten Tag erfolgte die Aufreinigung der DNA. Nach mehrfachem Spülen wurde die DNA nach dem Protokoll von JAX Mice Database mit den Primern, der Jaq-Polymerase, H₂O und den Nukleotiden im Cyclyer nach vorgegebenem Programm vervielfältigt. Nach Ablauf des Programmes wurde die DNA auf ein 1,5% iges Agarose-Gel gegeben. Die Banden wurden unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht und fotografiert. Als Kontroll-DNA diente die Schwanzprobe einer B6-Wildtyp-Maus.

2.8. Präparation aus dem Fettgewebe

Verwendete Mäuse des Stammes C57BL/6J waren zum Zeitpunkt der Präparation etwa 8 Wochen alt. Zur Präparation der ASC wurden die Wildtyp- und Knockout-Mäuse mit CO₂ narkotisiert. Nach der Euthanasierung und Fixierung erfolgte die Entnahme von Fettgewebe an Bauch und Nacken. Das Fettgewebe wurde in ein Falcon mit PBS gegeben, wo es oben schwimmt, während unerwünschtes Gewebe untergeht. Unter sterilen Bedingungen wurde das Fettgewebe in einer Petrischale homogenisiert. Daraufhin erfolgte die Resuspension in 50%iger Kollagenase IV-Lösung (0,5 mg Kollagenase 4 ml MEM α +10 μ l 2mM Glutamin + 10 μ l 1% Pen/Strep). Pro verwendeter Maus wurden 5 ml Kollagenase IV Lösung eingesetzt. Es erfolgte die Inkubation bei 37°C für 45 min auf einem Schüttler. Im Anschluss wurde das Gemisch auf- und abpipettiert, um die Zellen freizugeben.

Die über ein 100 µm Sieb filtrierte Lösung wurde anschließend für 10 Minuten bei 1000 rpm und 23° C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Es wurde zweimal mit 10 ml PBS und einmal mit 5 ml Erylyse-Puffer gewaschen. Zur Kultivierung wurden die gewonnenen Stammzellen mit 5 ml Kulturmedium (s.u.) in eine T25 Kulturflasche geben. Nicht adhärente Zellen wurden nach 24 Stunden durch Wechsel des Mediums aus der Kultur entfernt. Sobald die Zellen zu 80% konfluent waren, wurden sie abgeerntet und in T75-Kulturflaschen expandiert.

2.9. Kultivierung und Kryokonservierung

Die ASC wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Bei 80% konfluenten Zellen in einer Kulturflasche wurden die Stammzellen abgeerntet. Das Kulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Danach konnte in proteinarmer Umgebung das 0,4 %-ige Trypsin wirken und die Zellen vom Boden der Kulturflasche lösen. Unter dem Lichtmikroskop erfolgte die Kontrolle, ob die Zellen noch am Plastikboden adhärent sind oder schon im Trypsin schwimmen. Anschließend wurde die Aktivität des Trypsins mit Medium gestoppt, die ASC in neue Kulturflaschen gegeben und die Passage erhöht. Das Medium setzte sich wie folgt zusammen: 500 ml MEM α + 100 ml FCS + 5 ml 2mM Glutamin + 5 ml 1% Pen/Strep. Alle 3-4 Tage wurde bei nicht-konfluenten Zellen das Medium gewechselt. Zur Kontrolle und Vergleichbarkeit wurde tabellarisch festgehalten, welche Zellen wann expandiert werden konnten. Zur Fotodokumentation wurden je 50 000 Zellen in 2 ml Kulturmedium auf eine 12 well Platte gegeben und nach Kultivierung von 2 Tagen fotografiert. Die erhaltenen Bilder wurden mit Hilfe von Microsoft Picture Manager und Microsoft Paint bearbeitet und mit Markierungen versehen.

Die Stammzellen wurden bis zu einer Passage von 5 expandiert. Nach dieser Phase wurden alle MSC einmal kryokonserviert. Hierfür wurden die Zellen mit 0,4%igem Trypsin abgeerntet und mit PBS gewaschen. Nach der Zählung der Zellen mit Trypanblau in einer Neubauer Zählkammer unter dem Lichtmikroskop wurden die ASC in einer Konzentration von 1 Million pro vial in einer Lösung aus 50 % MEM α , 40 % FCS und 10 % DMSO bei -80°C konserviert. Später wurden die Zellen im Wasserbad aufgetaut, gewaschen und mit Kulturmedium in eine T175 Kulturflasche gegeben.

2.10. Phänotypisierung

Um festzustellen, welche Oberflächenproteine die Knockout-Stammzellen besitzen, wurden sie per Durchflusszytometer analysiert. Nach dem Abernten und Zählung der Zellen (s.o.) wurden zur Färbung in einer 96-well Platte 200 000 Zellen pro well gegeben und mit Antikörpern gegen Oberflächenantigene für 30 Minuten bei 4° C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 200 µl FACS-Puffer gewaschen und bei 1500 rpm für 5 Minuten bei 4° C zentrifugiert. Das gefärbte Zellpellet am Boden wurde in FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Zur Compensation des Durchflusszytometers wurden jeweils B6wt-ASC in ungefärbtem Zustand verwendet. Als Kontrolle wurde mit Antikörpern gegen IgG gefärbt, da diese auf mesenchymalen Stammzellen definitionsgemäß nicht vorkommen. Der FACS-Puffer setzt sich aus 5 g Bovinem Serum Albumin mit 1 g Natriumazid in 1000 ml PBS zusammen.

Auswertung: Die FACS-Daten wurden mit FlowJo 7.6.1 ausgewertet. Zunächst wurden FSC und SSC in einem Streudiagramm gegeneinander aufgetragen. Es erfolgte die Entfernung PI-negativer Zellen aus der Auswertung, die toten Zellen entsprechen. Danach konnten die einzelnen fluoreszierenden Stoffe mit ihren gekoppelten Antikörpern einzeln in Histogrammen dargestellt werden.

2.11. Differenzierung zu Adipozyten und Färbung mit Oil-Red

Zur Überprüfung der Fähigkeit zur Differenzierung in diverse Gewebe wurden die ASC verschiedenen Differenzierungsstimuli ausgesetzt. Für die Differenzierung zu Adipozyten wurden nach dem Abernten mit Trypsin und dem Zählen der Zellen mit Trypanblau je 50 Tausend Zellen pro well auf einer 12 well Platte mit 2 ml Medium versetzt. Kontrolle und Differenzierung von jeder Linie wurden dabei nebeneinander aus den gleichen Zellen angelegt. Zur Adhäsion der Zellen wurden diese über Nacht in normalem Kulturmedium belassen, am nächsten Tag wurde bei den Differenzierungen das Differenzierungsmedium (Zusammensetzung siehe Tabelle 4) zugegeben. Anschließend erfolgte der Mediumswechsel alle 3-4 Tage. An Tag 7 der Differenzierung wurden die Zellen gefärbt. Zur Färbung mit Oil-Red-O wurde zunächst eine Stammlösung hergestellt, für die 175 mg Red-Oil-O in 50 ml Isopropanol gelöst wurden. Diese Lösung wurde über Nacht bei 37°C gerührt, am nächsten Tag filtriert und bei 4°C gelagert. Für die Färbung wurde eine

verdünnte Arbeitslösung mit 60% Stammlösung und 40% destilliertem Wasser benutzt.

Das Medium wurde aus den wells abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 2 ml 10%iger Formaldehydlösung wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem vorsichtigen Abpipettieren wurden die wells mit 60 %-igem Isopropanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Hierauf erfolgten die Zugabe von 2 ml Red-Oil-O Arbeitslösung und die Inkubation für 30 min. Nach dieser Färbung wurden die Adipozyten und Kontrollen mit Wasser mikroskopiert und fotografiert. Die Differenzierung galt als erfolgreich, wenn reichlich Adipozyten mit Fetteinlagerungen in den Differenzierungen vorhanden waren und in der Kontrolle keine Fettvakuolen nachweisbar waren. Die erhaltenen Bilder wurden mit Hilfe von Microsoft Picture Manager und Microsoft Paint bearbeitet und mit Markierungen versehen.

20,476 ml MEM α	10 nM Dexamethason
0,25 ml 2mM Glutamin	60 μ M Indomethacin
0,25 ml 1% Pen/Strep	2 μ M Insulin
3,75 ml FCS	1250 μ g L-Ascorbinsäure
500 μ M IBMX	

Liste 1 Zusammensetzung des Differenzierungsmediums der Adipozyten

2.12. Differenzierung zu Osteoblasten und Färbung nach von Kossa

Für die Differenzierung zu Osteoblasten wurden nach dem Abernten mit Trypsin und dem Zählen mit Trypanblau je 100 Tsd Zellen pro well auf einer 6 well Platte mit 3 ml Medium versetzt. Kontrolle und Differenzierung von jeder Linie wurden dabei nebeneinander aus gleichen Zellen angelegt. Zur Adhäsion der Zellen wurden diese über Nacht in normalem Kulturmedium belassen, am nächsten Tag auf die Differenzierungen das Differenzierungsmedium (Zusammensetzung siehe Liste 1) gegeben. Anschließend erfolgte der Mediumswechsel alle 3-4 Tage. An Tag 14 der Differenzierung wurden die Zellen gefärbt. Für die Färbung der Osteoblasten wurden 5 %-ige Silbernitratlösung, 1 %-ige Pyrogallolsäure und 5 %-ige Natriumthiosulfatlösung verwendet. Alle Lösungen wurden mit zweifach destilliertem Wasser angesetzt, damit kein Kalk enthalten ist, der das Ergebnis durch Ausfällen von Kalk verfälschen würde.

Die wells wurden zwischen allen Arbeitsschritten gründlich mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Zunächst erfolgte die Zugabe von 5 %-iger Silbernitratlösung. Bei Raumtemperatur und hellem Licht wurde 40 Minuten lang inkubiert, danach wurde die Platte für 1-2 min unter UV-Licht gehalten. Als nächstes Zugabe von 1 %-iger Pyrgallolsäure, welche 5 Minuten inkubierte. Es folgte die Zugabe von 5 %-iger Natriumthiosulfatlösung für weitere 5 Minuten. Nach der Färbung wurden die Zellen ohne Zugabe von Wasser mikroskopiert und fotografiert. Die Differenzierung wurde als erfolgreich gewertet wenn die Zellen der Differenzierung reichlich Kalk eingelagert hatten und in den Kontrollen kein Kalk enthalten war. Die erhaltenen Bilder wurden mit Hilfe von Microsoft Picture Manager und Microsoft Paint bearbeitet und mit Markierungen versehen.

20 ml MEM α	10 nM Dexamethason
0,25 ml 2mM Glutamin	5 mM β -Glyzerophosphat
0,25 ml 1% Pen/Strep	1250 μ g L-Ascorbinsäure
3,75 ml FCS	

Liste 2 Zusammensetzung des Kulturmediums zur Differenzierung zu Osteoblasten

2.13. Mixed Lymphocyte Reaction (MLR), Mitogen-aktivierte Lymphozyten-Proliferation

Die MLR ist ein immunologisches Verfahren, in dem responder Zellen durch die Exposition auf allogene Zellen proliferieren. Alternativ kann die Lymphozyten-Proliferation durch Mitogene wie CD 3/CD 28-aktivierende Antikörper induziert werden. Nach 24-28 Stunden finden sich vor allem CD4⁺ Lymphozyten, nach weiteren 48 Stunden haben die CD8⁺ Lymphozyten besonders proliferiert. Für die vorliegende Arbeit wurden eine konstante Zahl an Balb/c-Splenozyten, die durch CD 3-/CD 28-Antikörper aktiviert wurden, einer steigenden Anzahl an ASC ausgesetzt. Anhand der eingeschränkten Proliferation der Lymphozyten kann das immunsuppressive Potential der verschiedenen ASC-Linien abgeleitet werden. Das Interesse galt hierbei vor allem der Frage ob die Knockout-ASC im Vergleich zu den Wildtyp-Stammzellen ein anderes Verhalten zeigen. Tabelle 6 zeigt die Zusammensetzung des für die MLR verwendeten Mediums.

500 ml RPMI 1640 (1x) [gibco]	5 ml 100mM Na-Pyruvat Solu.
0,5 ml 50 mM 2-Mercaptoethanol	5 ml 1% Pen/Strep
5 ml MEM Vitamin Solution	5 ml 200 mM L-Glutamin
5 ml MEM-non essential Amino-Acids	50 ml FCS
10 ml 1M HEPES	

Liste 3 Zusammensetzung Medium der MLR

Isolierung der Splenozyten aus der Milz: Zur Gewinnung der Balb/c-Splenozyten (SC) wurde nach der Euthanasie der Balb/c-Maus und der Eröffnung der Bauchhöhle die Milz entnommen und in PBS auf Eis konserviert. Unter sterilen Bedingungen wurde die Milz mit PBS gespült und die Zellen freigesetzt. Die Zellen wurden über ein 100 µm-Sieb in ein 50 ml Falcon gegeben. Nach dem Zentrifugieren für 5 min bei 4°C und 1500 rpm wurden die SC in 5 ml Erylyse-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Über ein 40 µm-Sieb wurden die in PBS resuspendierten Splenozyten in neues Falcon gegeben. Nach der Zählung in einer Neubauer Zählkammer wurden ungefärbte Splenozyten für die Compensation am Durchflusszytometer entnommen.

Färbung mit CFSE: Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester ist ein zur Zellfärbung verwendetes, fluoreszierendes Molekül, das über seine Succinimidyl-Gruppe kovalent an die intrazellulären Moleküle der gefärbten Zellen bindet. Es wird bei jeder Zellteilung zu gleichen Teilen an die Tochtergeneration weitergegeben und ermöglicht so durch Abnahme der Fluoreszenz die Überwachung der Proliferation in einer MLR. Durch seine kovalenten Bindungen wird CFSE lange in der Zelle gehalten und kann in bis zu 8 Tochtergenerationen nachgewiesen werden. Zur Färbung wurden die in PBS resuspendierten Splenozyten in einer 1:1000 Verdünnung mit CFSE versetzt. Es erfolgte die Inkubation über 10 min bei 37°C. Durch Zugabe von 30 ml MLR-Medium wurde die Färbung abgestoppt. Nach Belassen der Zellen für 20 min bei 4°C wurden die gefärbten Zellen mit MLR-Medium gewaschen. Die CFSE-positiven SC wurden erneut gezählt und auf eine Konzentration von 2×10^6 /ml verdünnt.

Bereitstellung der ASC: Es wurden von jeder Linie (Wildtyp-ASC, IFN γ – Knockout-ASC und Ptgs-2-Knockout-ASC) drei T175 Kulturflaschen abgeerntet, gezählt und auf eine Endkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml gebracht.

T-Zell-Aktivierung mit CD 3-/CD 28-Antikörpern: CD 3 ist ein Teil des T-Zell Rezeptors und CD 28 ein kostimulatorisches Protein auf der Oberfläche der T-

Zellen. Die Dynabeads CD 3/CD 28 sind 4,5 µm große superparamagnetische Perlen mit kovalent gebundenen anti-CD 3- und anti-CD 28-Antikörpern, die die Lymphozyten-Proliferation auslösen.

Positivkontrolle mit Concavalin A: Das Mitogen Concavalin A (Con A) wurde in einer Endkonzentration von 8 µg/ml eingesetzt um die maximale Proliferation der Splenozyten zu erfassen.

Tabelle 4 zeigt das Pipettierschema für den Ansatz der MLR.

Verdünnung	Zellen	Proliferation durch	Sonstiges
Positiv Kontrolle	Balb/c-SC 100000Z CFSE+	ConA 100 µl	Medium 50 µl
1:1	Balb/c-SC 100 000 Z CFSE+ ASC 100 000 Z	CD 3/CD 28 50 µl	-
3:4	Balb/c-SC 100000Z CFSE+ ASC 75000Z	CD 3/CD 28 50 µl	Medium 25 µl
1:2	Balb/c-SC 100000Z CFSE+ ASC 50000Z	CD 3/CD 28 50 µl	Medium 50 µl
1:5	Balb/c-SC 100000Z CFSE+ ASC 20000Z	CD 3/CD 28 50 µl	Medium 80 µl
1:10	Balb/c-SC 100000Z CFSE+ ASC 10000Z	CD 3/CD 28 50 µl	Medium 90 µl
1:20	Balb/c-SC 100000Z CFSE+ ASC 5000Z	CD 3/CD 28 50 µl	Medium 95 µl
Kontrolle	Balb/c-SC 100000Z CFSE+	CD 3/CD 28 50 µl	Medium 100 µl
Negativ Kontrolle	Balb/c-SC 100000Z CFSE+	-	Medium 150 µl
Comp.	Balb/c-SC 100000Z CFSE-	CD 3/CD 28 50 µl	Medium 100 µl

Tabelle 4 MLR-Ansatz nach folgendem Pipettierschema in einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen und Rundboden (am Beispiel ASC-B6wt, gleiches gilt für ASC-IFN γ und ASC-Ptgs). Es wurden je 3 wells pro Verdünnung angesetzt.

Auswertung: Die Lymphozyten-Proliferation wurde nach 5 Tagen beendet. Es wurden 150 µl Medium pro Ansatz abgenommen und gleiche Ansätze gepoolt. Nach dem Zentrifugieren wurde das übrige Medium abgeschüttet. Die Zellen für

die Compensation wurden in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert und mit 1 µl CD 4-PE/CD 4-APC beziehungsweise mit 3,3µl PI versetzt. Die übrigen Proben der CFSE positiven Zellen wurden mit CD 3-PE und CD 8a-APC (Konzentration 1:150) sowie mit Propidium-Jodid (Konzentration 1:300) gefärbt. Das Propidium-Jodid dient der Entfernung toter Zellen aus der Auswertung. Bei 4° C wurde 30 min lang inkubiert, danach mit 200 µl FACS-Puffer gewaschen. Die Messung erfolgte in 150 µl FACS-Puffer am FACS Calibur. Die FACS-Daten wurden mit FlowJo 7.6.1 ausgewertet. Zunächst wurden FSC und SSC in einem Streudiagramm gegeneinander aufgetragen. Hierauf folgte das Einziehen des ovalen Lymphozyten-Gates. PI negative Lymphozyten entsprechen den lebenden Lymphozyten. Unter diesen wurden CFSE und CD 3 gegeneinander aufgetragen und nur die CD 3+ Lymphozyten weiter untersucht. Es wurde der Anteil der proliferierten Zellen ermittelt, indem die Tochtergeneration von der Elterngeneration getrennt wurde. Anschließend wurde die Anzahl der proliferierten Lymphozyten miteinander verglichen. Um festzustellen, ob die Ergebnisse der MLR signifikant sind, wurden die Daten mit SPSS 21 ausgewertet. Es wurden T-Tests durchgeführt sowie Diagramme der Mittelwerte mit Standardabweichung erstellt.

3. Ergebnisse

3.1. Genotypisierung

In dieser Arbeit werden die Eigenschaften und das immunsuppressive Verhalten von IFN γ - und COX-2-Knockout-Stammzellen mit denjenigen eines Wildtyp-Stammes verglichen. Zur Qualitätssicherung der Knockout-Genetik wurden DNA-Kontrollen aus Schwanzproben der Knockout-Mäuse durchgeführt. Nach Vervielfältigung des veränderten Genabschnittes mittels PCR wurden die Proben auf ein Agarose-Gel aufgetragen und mit standardisierten DNA-Proben verglichen.

Die DNA der IFN γ -Knockout-Mäuse zeigte jeweils eine Bande bei 280 Basenpaaren (bp), so wie es durch das vorgegebene Protokoll des Herstellers erwartet wurde. Der Wildtyp lag bei 189 bp. Das PCR-Ergebnis ist in Abbildung 4 dargestellt.

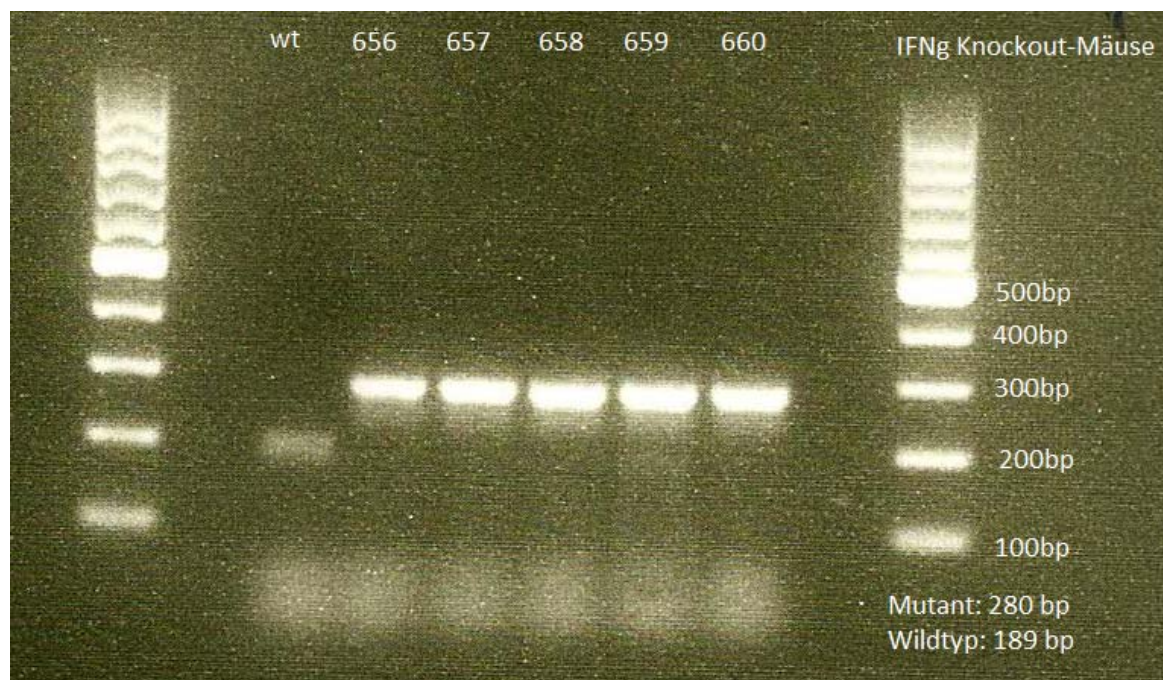


Abbildung 4 PCR-Ergebnis der IFN γ -Knockout-Mäuse: die Banden des PCR-Produktes oIMR0587 ifng γ 1 befinden sich auf Höhe der Markierung mit 280 bp, während die Bande des Wildtyps bei 189 bp liegt

Die DNA der Ptgs2-Knockout-Mäuse lief erwartungsgemäß im Agarose-Gel bis zur Markierung von 585 bp, während die Wildtyp-Kontrolle bei 493 bp stoppte. Dies entspricht ebenfalls den Angaben des Herstellers. Abbildung 5 zeigt das unter

ultraviolettem Licht fotografierte Agarose-Gel mit den DNA-Banden der Ptgs-2-Knockout-Mäuse.

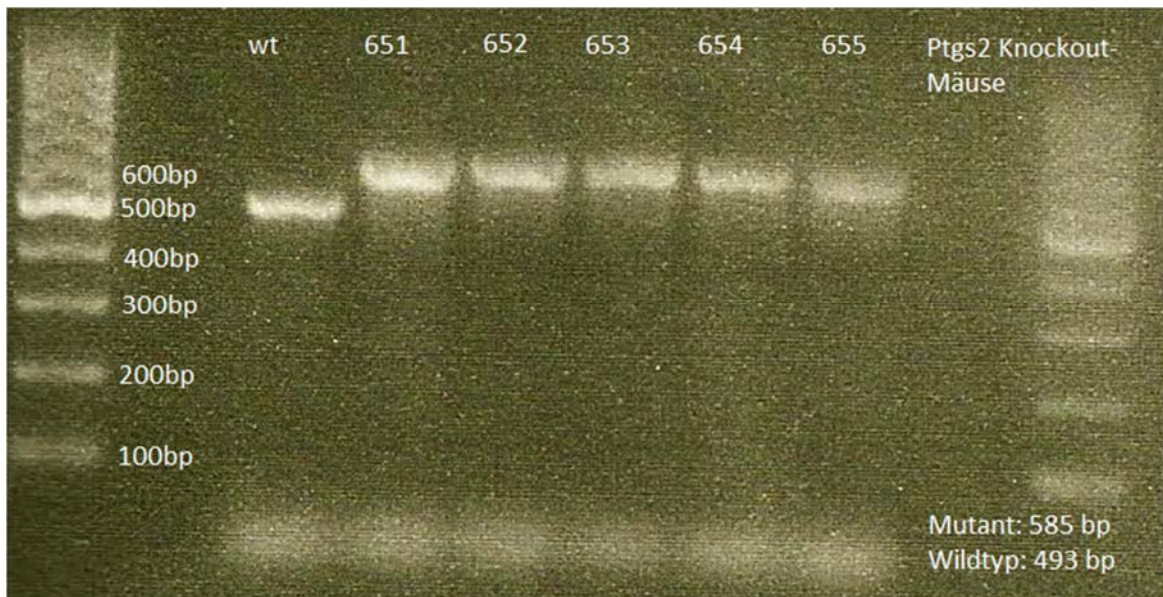


Abbildung 5 PCR-Ergebnis der Ptgs2-Knockout-Mäuse: die Banden des PCR-Produktes der Schwanzproben der Ptgs2-Tiere befinden sich auf Höhe der Markierung mit 585 bp, während der Wildtyp bei 493 bp liegt.

Damit konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Tiere die korrekte genetische Grundlage für die vorgesehenen Versuche aufweisen.

3.2. Knockout-ASC sind kultivierbar

Mesenchymale Stammzellen sind plastikadhärente Zellen mit kleinem Zellkörper und langen, schmalen Fortsätzen, die sich in Kultur in Nestern vermehren und in verschiedene Gewebe wie unter anderem Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten differenzieren können. Die Gewinnung der mesenchymalen Stammzellen erfolgte aus dem Bauchfettgewebe. Um die Knockout-Stammzellen mit denjenigen des Wildtyps vergleichen zu können, wurden sie unter oben genannten Bedingungen kultiviert. Anhand ihrer Morphologie können sie von anderen Zelllinien unterschieden werden. Die Kultivierung erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 37°C und 5% CO₂. Nach einer Kultivierung und Expansion bis Passage 5 wurden die Zellen wie auf Seite 18 beschrieben kryokonserviert. Nach Auftauen und erneuter Zellkultur wurden die ASC für Versuche verwendet.

Wildtyp-ASC vom Stamm C57BL/6J zeigten ein schnelles Wachstum mit einer Passagezeit von 3-4 Tagen. Die Zellen wurden bei 80% konfluenten Zellen um eine Passage erhöht. Zur Darstellung der Morphologie wurden Wildtyp-ASC der Passage 13 nach Kultivierung für 2 Tage in einer 6-well-Platte unter dem Lichtmikroskop fotografiert. Abbildung 6 zeigt das Wachstum in Zellgruppen und die Morphologie der Wildtyp-ASC. Man erkennt die langen, schmalen Zellfortsätze, kleine Zellkörper und die dunklen Zellkerne.

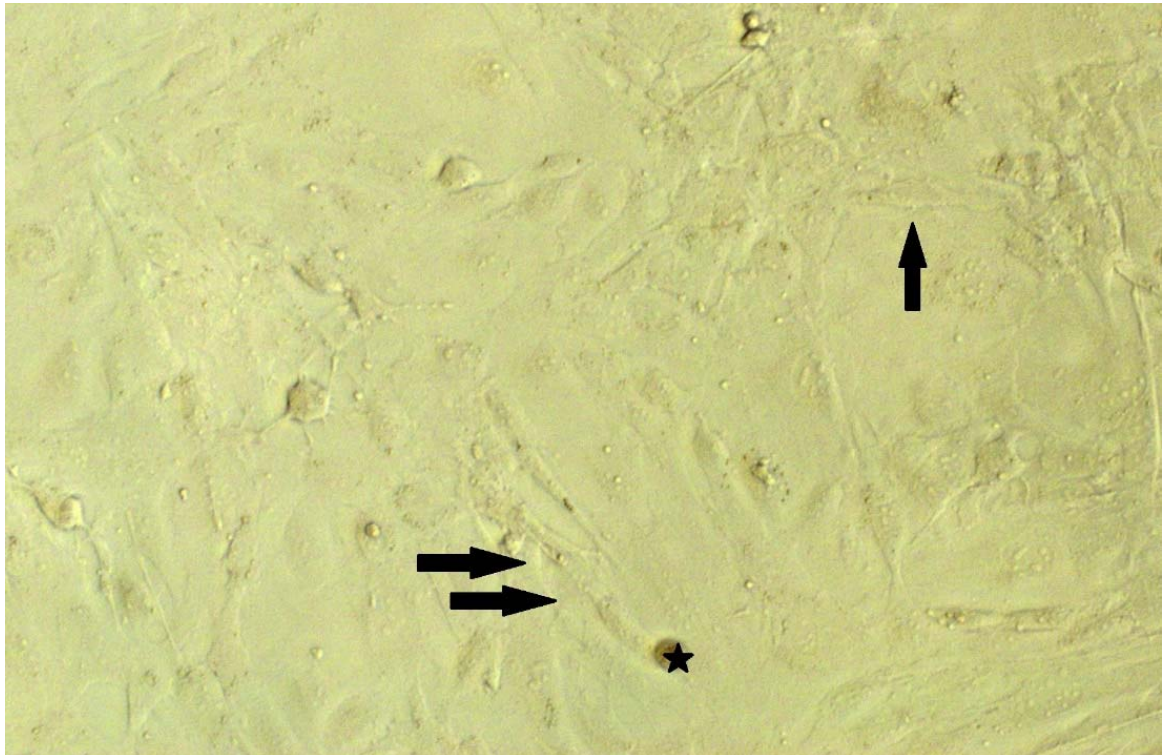


Abbildung 6 ASC des wildtyp-Stammes nach Kultivierung für 2 Tage in einer 6-well-Platte. Es zeigen sich die typischen Charakteristika der mesenchymalen Stammzellen: Kleine Zellkörper (↑), dunkle Zellkerne (Stern), lange und schlanke Zellfortsätze (↑↑). Die Zellen wachsen in Kolonien und ähneln Fibroblasten. 20x Vergrößerung

Entsprechend der erfolgreichen Kultivierung der Wildtyp-Stammzellen wurde mit den Knockout Zellen verfahren, die ebenso erfolgreich kultiviert werden konnten.

IFN γ -Knockout-ASC wuchsen bedeutend langsamer als die Wildtyp-Zellen und benötigten daher im Mittel 7 Tage, bis sie zu 80% konfluent waren und um eine Passage erhöht werden konnten (Daten nicht dargestellt). Für die Abbildung der Morphologie wurden IFN γ -Knockout-ASC der Passage 7 verwendet. Abbildung 7 zeigt die ASC der IFN γ -Knockout-ASC nach der Kultur für 2 Tage in einer 6-well-Platte. Es zeigen sich die Charakteristika mesenchymaler Stammzellen.

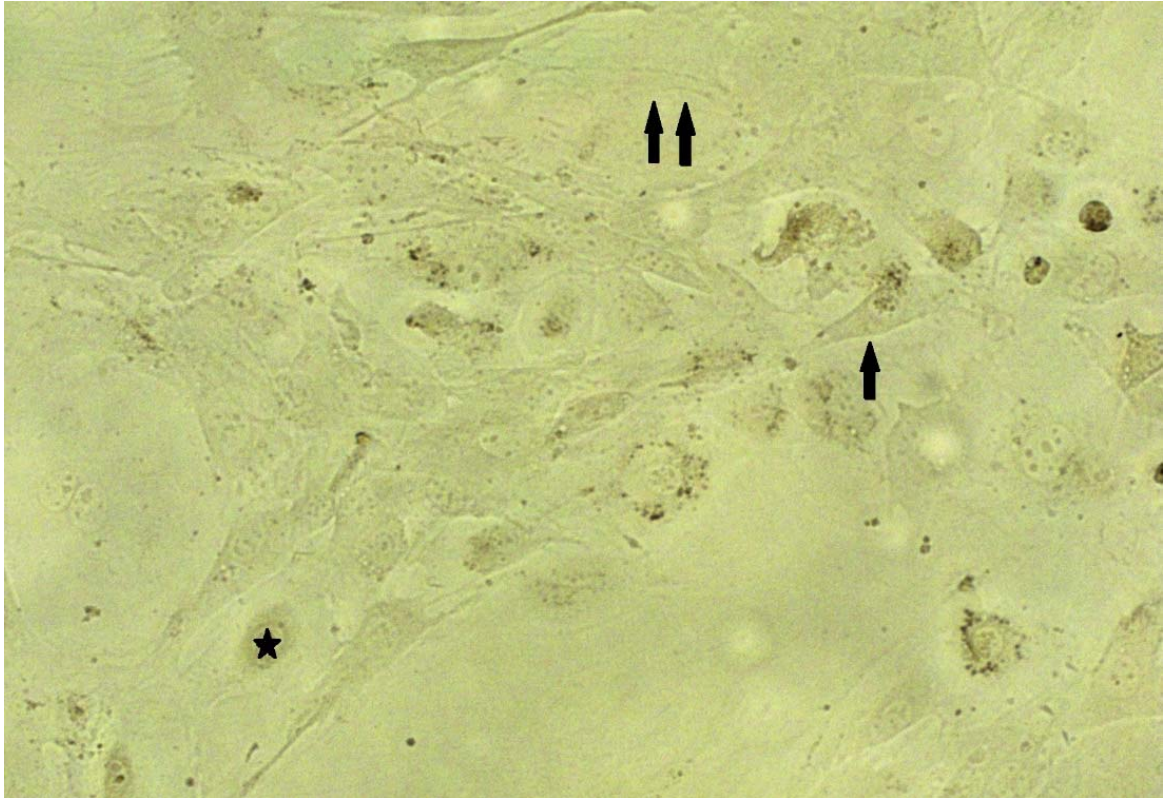


Abbildung 7 ASC der IFN γ -Knockout Linie nach Kultivierung für 2 Tage in einer 6 well Platte, 20x vergrößert. Man erkennt die klassische Morphologie mesenchymaler Stammzellen: dunkle Zellkerne (Stern), kleine Zellkörper (↑), lange und schmale Zellfortsätze (↑↑).

Ptgs2-Knockout-Zellen zeigten entsprechend der Wildtyp-Zellen ein schnelles Wachstum und konnten alle 3-4 Tage um eine Passage erhöht werden. Für die fotografische Darstellung wurden Ptgs2-Knockout-ASC der Passage 10 für 2 Tage in einer 6-well-Platte kultiviert und folgend unter dem Lichtmikroskop zur Darstellung gebracht. Auch die ASC dieser Linie wuchsen in Nestern und entsprachen den morphologischen Grundsätzen der Stammzellen, wie in Abbildung 7 dargestellt wird.

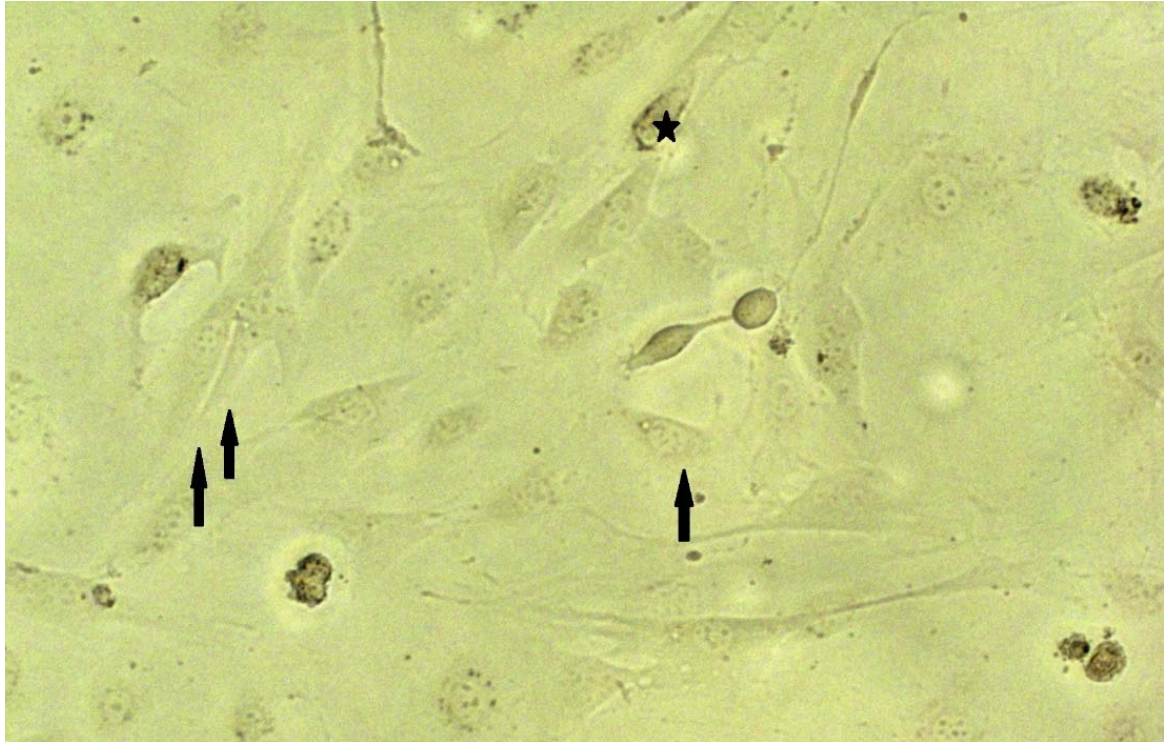


Abbildung 8 mASC der *Ptgs2*-Knockout Linie nach Kultivierung für 2 Tage in einer 6 well Platte, 20x vergrößert. Man erkennt die klassische Morphologie mesenchymaler Stammzellen: dunkle Zellkerne (Stern), kleine Zellkörper (↑), lange und schmale Zellfortsätze (↑↑).

3.3. Knockout-ASC besitzen ASC-typische Oberflächenmarker

Mesenchymale Stammzellen werden unter anderem anhand spezifischer Oberflächenmoleküle identifiziert. Typisch ist die Expression von CD 29, CD 44, CD 73, CD 90, CD 105 und CD 106 auf der Zelloberfläche und das Fehlen von CD 11b, CD 19, CD 34, CD 45. Aus dem Fettgewebe präparierte Stammzellen sind für CD 34 positiv, dieses Merkmal kann mit zunehmender Passagezeit verschwinden. Zur Untersuchung des Antigenprofils wurde eine Analyse der Oberflächenmarker im Durchflusszytometer durchgeführt. Es wurden ASC jeder Linie mit verschiedenen Antikörpern versetzt. Die verwendeten Stammzellen waren zum Zeitpunkt der Phänotypisierung zwischen Passage 7 und 13 und zeigten eine normale Morphologie (s.o.).

Per Definition exprimieren mesenchymale Stammzellen keine Immunglobuline. Deswegen dient die Färbung mit IgG-Antikörpern als Negativ-Kontrolle.

Wildtyp-ASC des Stammes C57BL/6J exprimieren CD 29, CD 44, CD 73 und CD 106 und sind sehr schwach positiv für SCA-1, CD 105 und CD 34. Auf ihrer

Oberfläche sind die Moleküle CD 45R, H2Kd, MHC-II, CD 11c, CD 117, CD 19, H2Kb, CD 90.1, PD-1, CD 11b und CD 31 nicht vorhanden.

ASC der IFN γ -Knockout Mäuse zeigen auf ihrer Oberfläche CD 29, CD 44, CD 106 und CD 34 und sind schwach positiv für SCA-1, CD 73 und CD 105. Sie exprimieren folgende Merkmale nicht: CD 45R, H2Kd, MHC-II, CD 11c, CD 117, CD 19, H2Kb, CD 90.1, PD-1, CD 11b und CD 31.

Der Immunphänotyp der Ptgs2-Knockout-ASC zeigt eine starke Expression von CD 29, CD 44, CD 73, CD 106 und CD 34 sowie eine schwach positive Expression von SCA-1 und CD 105. Auf ihrer Oberfläche kommen CD 45R, H2Kd, MHC-II, CD 11c, CD 117, CD 19, H2Kb, CD 90.1, PD-1, CD 11b, CD 31.

Die Abbildungen 9 – 13 zeigen die Histogramme der Auswertung der Immunphänotypisierung der mesenchymalen Stammzellen der verschiedenen Linien. Es werden zunächst die positiven und nachfolgend die negativen Oberflächenantigene dargestellt. Alle hier abgebildeten Ergebnisse wurden mit mindestens drei verschiedenen Kultivierungen der präparierten MSC durchgeführt.

Ergebnisse

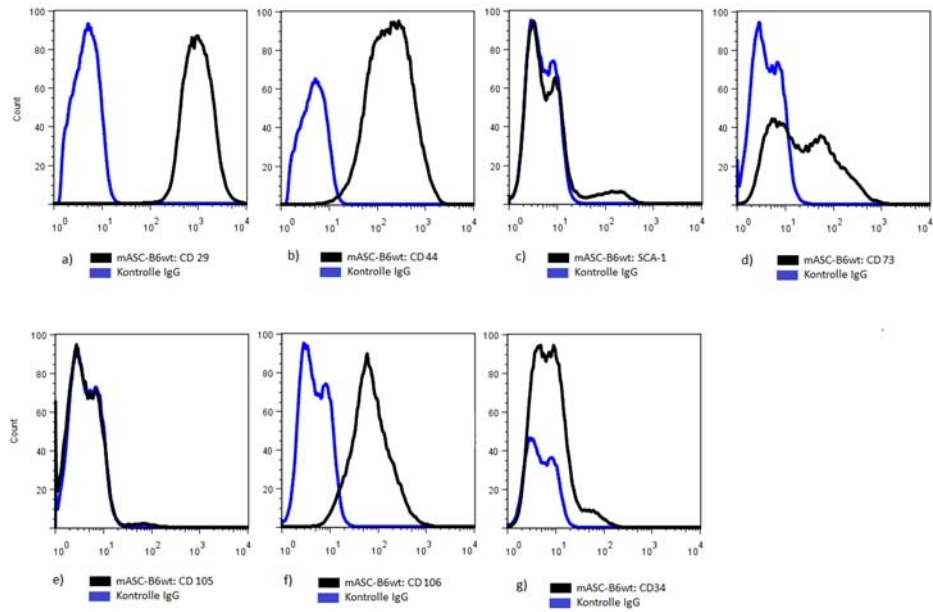


Abbildung 9 Charakterisierung des Wildtyp-Stammes: Die Zellen sind positiv für CD 29 (a), CD 44 (b), CD 73 (d), CD 106 (f) und sehr schwach positiv für SCA-1 (c), CD 105 (e) und CD 34 (g).

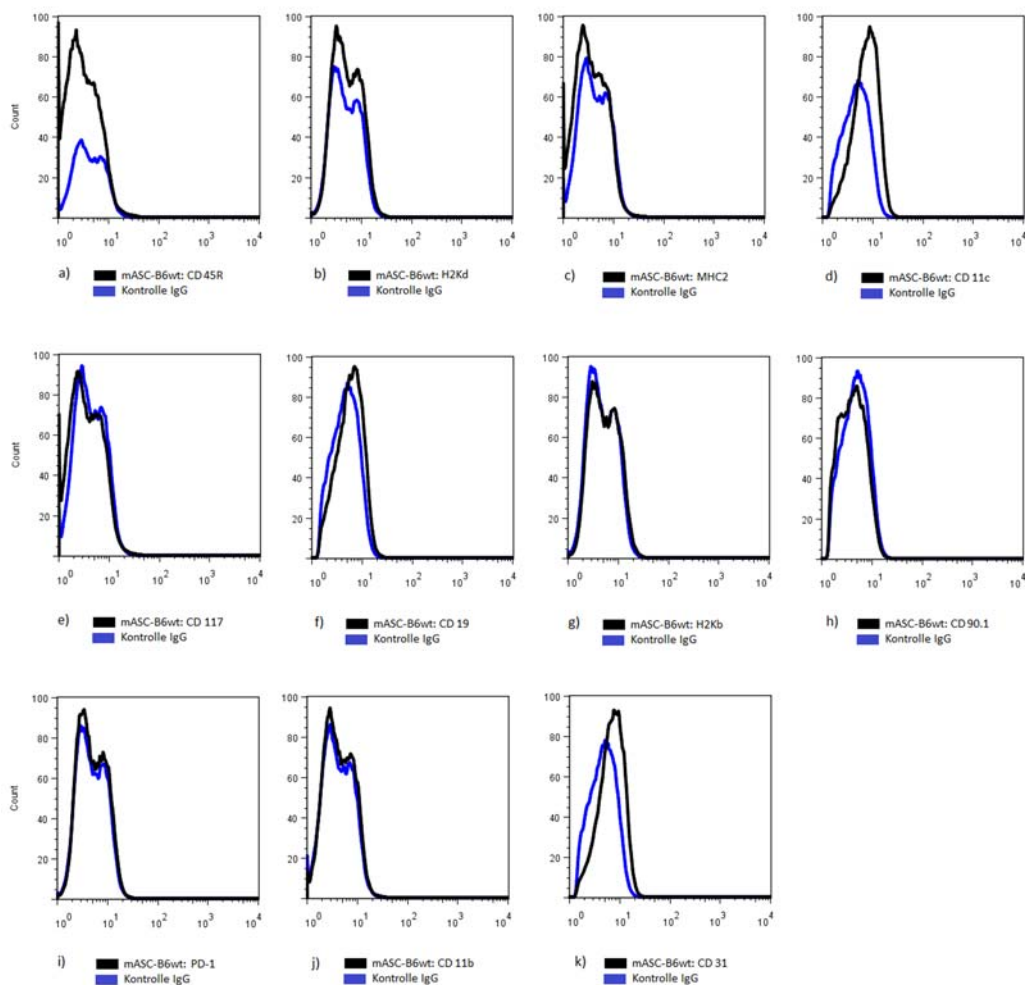


Abbildung 10 Wildtyp-Stammzellen sind negativ für CD 45R (a), H2Kd (b), MHC-II (c), CD 11c (d), CD 117 (e), CD 19 (f), H2Kb (g), CD 90.1 (h), PD-1 (i), CD 11b (j), CD 31 (k).

Ergebnisse

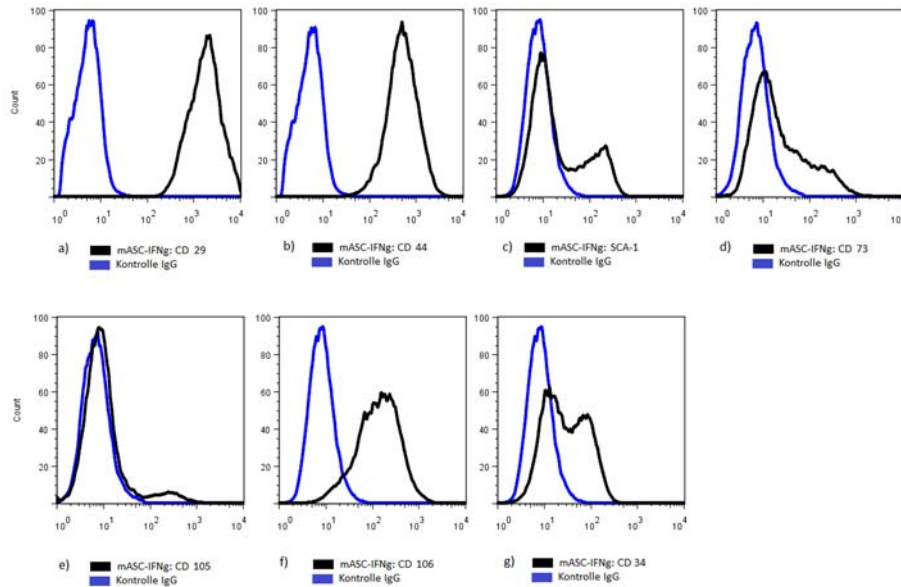


Abbildung 11 Charakterisierung des IFN γ -Knockout-Stammes: Die Zellen sind positiv für CD 29 (a), CD 44 (b), CD 106 (f), CD 34 (g) und schwach positiv für SCA-1 (c), CD 73 (d) und CD 105 (e).

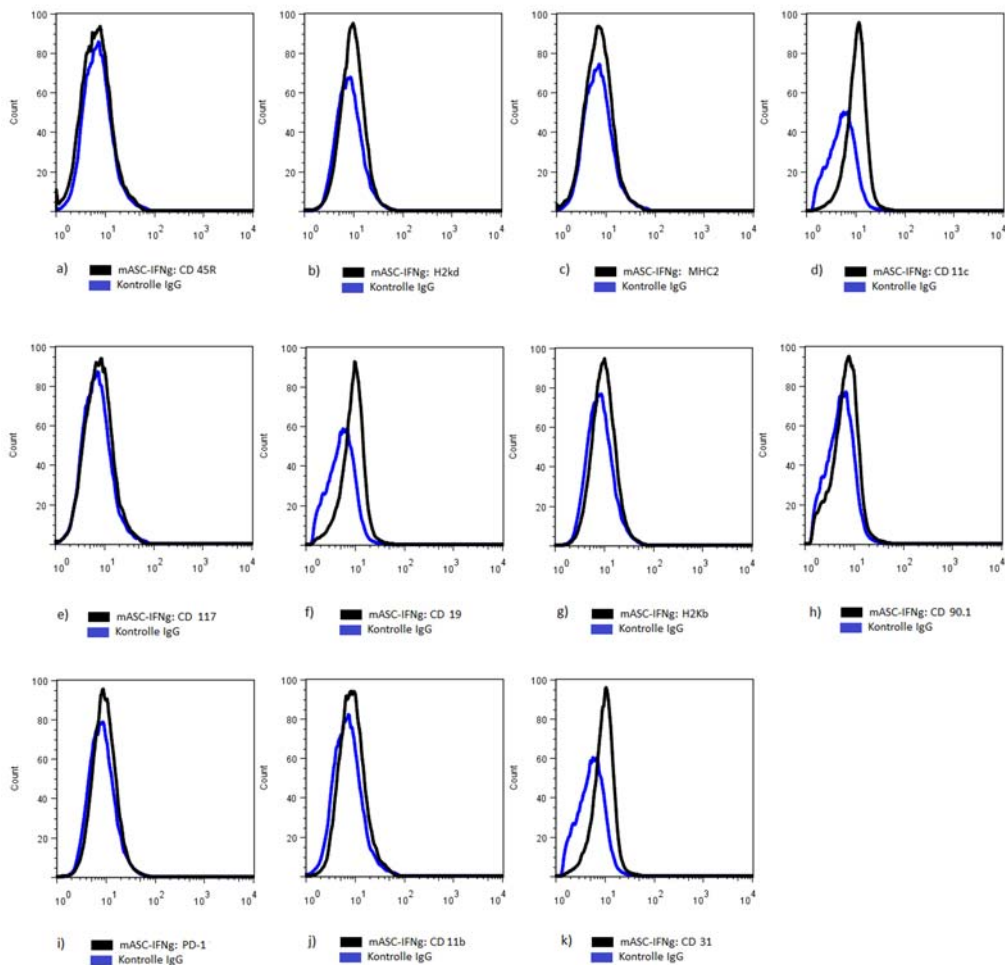


Abbildung 12 IFN γ -Knockout-Stammzellen sind negativ für CD 45R (a), H2Kd (b), MHC-II (c), CD 11c (d), CD 117 (e), CD 19 (f), H2Kb (g), CD 90.1 (h), PD-1 (i), CD 11b (j), CD 31 (k).

Ergebnisse

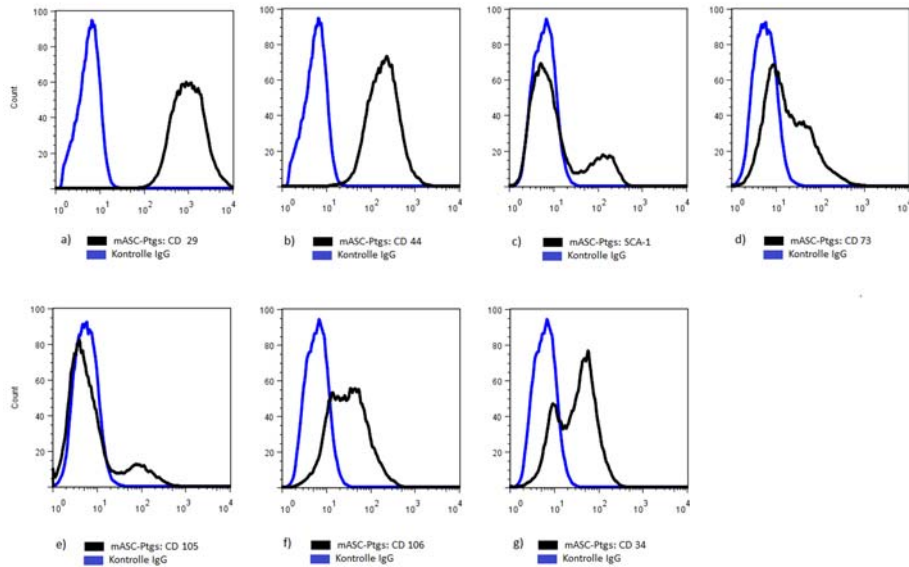


Abbildung 13 Ptgs-2-Knockout-Stammzellen sind positiv für CD 29 (a), CD 44 (b), CD 73 (d), CD 106 (f), CD 34 (g) sowie schwach positiv für SCA-1 (c), CD 105 (e).

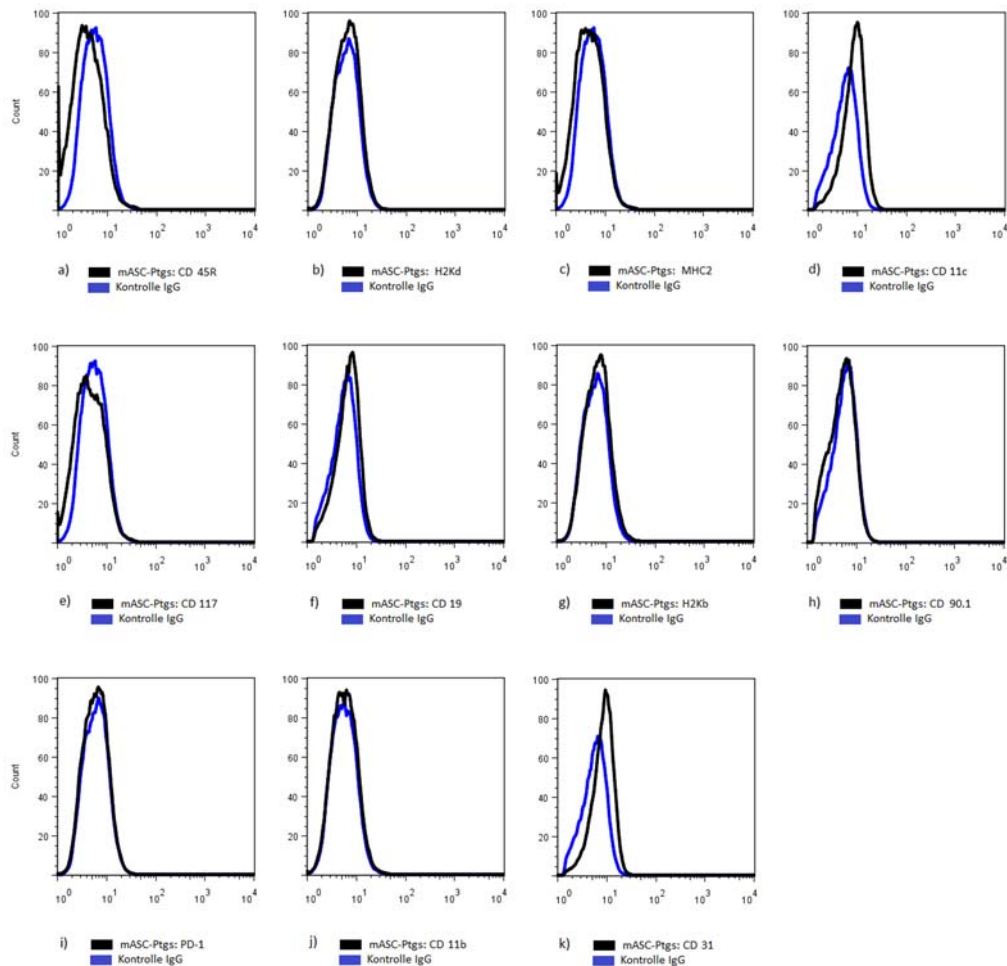


Abbildung 14 Ptgs2-Knockout-Stammzellen sind negativ für CD 45R (a), H2Kd (b), MHC-II (c), CD 11c (d), CD 117 (e), CD 19 (f), H2Kb (g), CD 90.1 (h), PD-1 (i), CD 11b (j), CD 31 (k).

3.4. Knockout-ASC differenzieren zu Adipozyten und Osteoblasten

Um das pluripotente Potential der Stammzellen nachzuweisen, wurden die Knockout-Stammzellen zeitgleich mit den Wildtyp-Zellen verschiedenen Differenzierungsstimuli ausgesetzt. Da sich mesenchymale Stamzellen in viele verschiedene Zellreihen entwickeln können (Osteoblasten, Adipozyten, Chondrozyten, Myoblasten u.a.) ist dies ein geeigneter Nachweis ihrer Identität sowie ihrer Funktionstüchtigkeit. Die Zellen waren bei Ansetzen der Versuche maximal 13 Mal passagiert. Sie verblieben für eine Nacht zur Adhäsion in Zellkulturmedium und wurden ab Tag 1 den Differenzierungsmedien ausgesetzt. Als Kontrolle wurden von jeder Zelllinie Zellen der gleichen Präparation und des gleichen Alters im Kulturmedium verwendet. Es erfolgte die Färbung und Fotodokumentation am Tage der Auswertung. Die dargestellten Ergebnisse waren an mindestens 3 verschiedenen Versuchsreihen reproduzierbar.

3.4.1. Differenzierung zu Adipozyten

Zur Differenzierung zu Adipozyten wurden die Zellen für 7 Tage einem Medium aus Isobutyl-Methylxanthin, Dexamethason, Indomethacin und Insulin ausgesetzt. Diese Umgebung induziert die Differenzierung zu Fettgewebszellen. ASC aller Linien ließen sich erfolgreich zu Adipozyten differenzieren, welche durch das Einlagern von Fettvakuolen charakterisiert sind. Die Adipozyten wurden mit Red-Oil-O gefärbt. Die Kontrollen wurden als negativ gewertet, wenn keine Vakuolen in der Kulturplatte sichtbar waren.

Die Bilder 15-17 zeigen die verschiedenen Linien nach der Differenzierung zu Adipozyten. Vergleichbare Adipozyten-Nester zeigten sich an allen Orten der Zellkulturplatte.

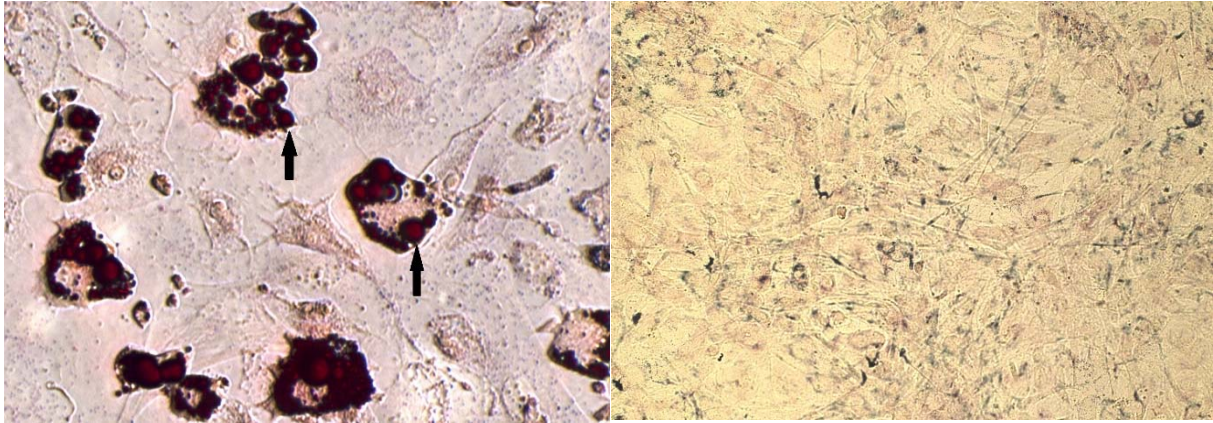


Abbildung 11 Wildtyp-ASC: Differenzierung zu Adipozyten (links, 40-fache Vergrößerung) und Kontrolle (rechts, 10-fache Vergrößerung). Man erkennt rot gefärbte Fettvakuolen (Pfeile), die in der Kontrolle nicht vorkommen.

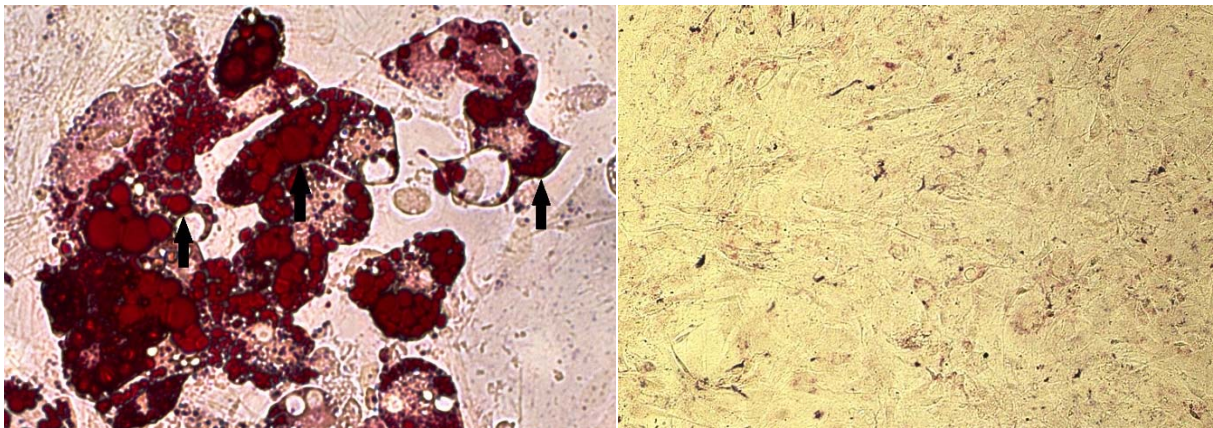


Abbildung 12 IFN γ -Knockout-ASC: Differenzierung zu Adipozyten (links) in 40-facher Vergrößerung und Kontrolle in 10-facher Vergrößerung (rechts). Die Differenzierung zeigt reichlich eingelagertes Fett (Pfeile), während in der Kontrolle keine Vakuolen vorkommen.

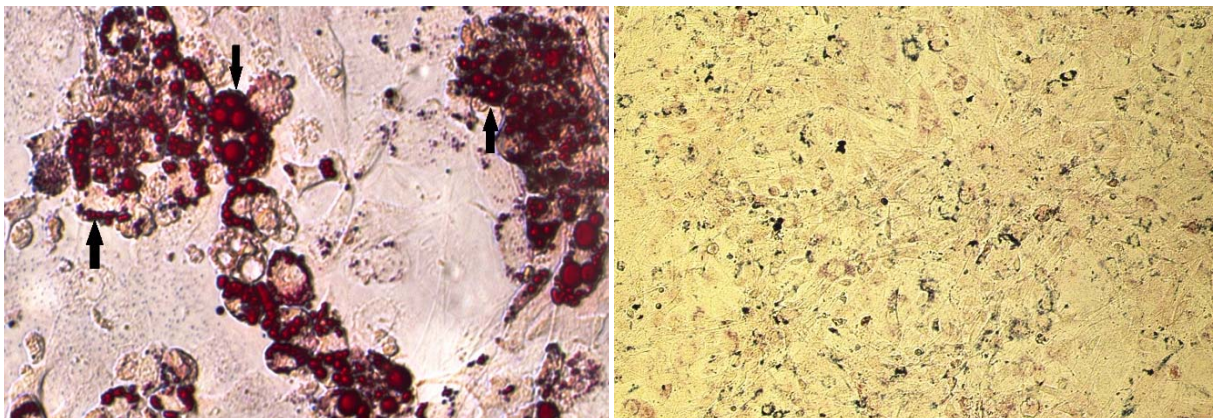


Abbildung 13 Ptg2-Knockout-ASC: Differenzierung zu Adipozyten (links in 40-facher Vergrößerung) und Kontrolle (10-fache Vergrößerung, rechts). Die Differenzierung zeigt reichlich eingelagerte Fettvakuolen (Pfeile), während in der Kontrolle keine Vakuolen vorkommen.

3.4.2. Differenzierung zu Osteoblasten

Zu Differenzierung zu Osteoblasten wurden die ASC einem Medium aus Dexamethason, Ascorbinsäure und anorganischem Phosphat ausgesetzt. Durch die Mineralisation der Matrix zeigt sich die Spezialisierung der Zellen zur Knochenbildung. Nach 14 Tagen wurden die Zellen mit Silbernitrat versetzt, das die Mineralisation durch Schwarzfärbung sichtbar macht. Als Kontrolle dienten Zellen derselben Linie, die in normalem Medium kultiviert wurden. Alle Linien differenzierten in maximal 18 Tagen zu Osteoblasten.

Die Bilder 18-20 zeigen eine Differenzierung der drei Zelllinien mesenchymaler Stammzellen zu Knochenmatrix-produzierenden Osteoblasten. Die Zellen in der Kontrolle differenzierten wie erwartet nicht. Vergleichbare Bereiche zeigten sich an allen Orten der Zellkulturplatte. Die Ergebnisse waren in mindestens drei Versuchsreihen reproduzierbar.

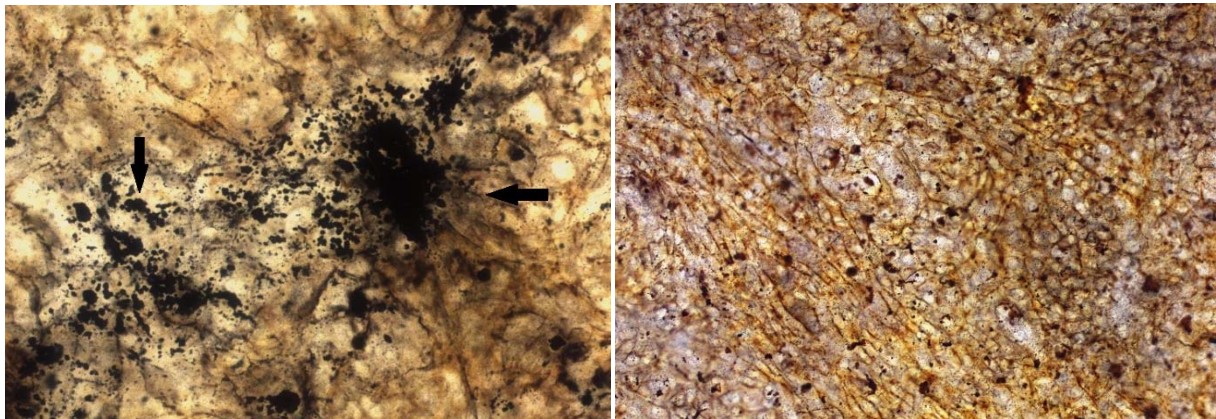


Abbildung 14 Wildtyp-mASC: Differenzierung zu Osteoblasten (links, 20-fache Vergrößerung) und Kontrolle (rechts, 10-fache Vergrößerung). Man erkennt links die Mineralisation der Matrix (Pfeile). In der Kontrolle kommen keine Kalkeinlagerungen vor.

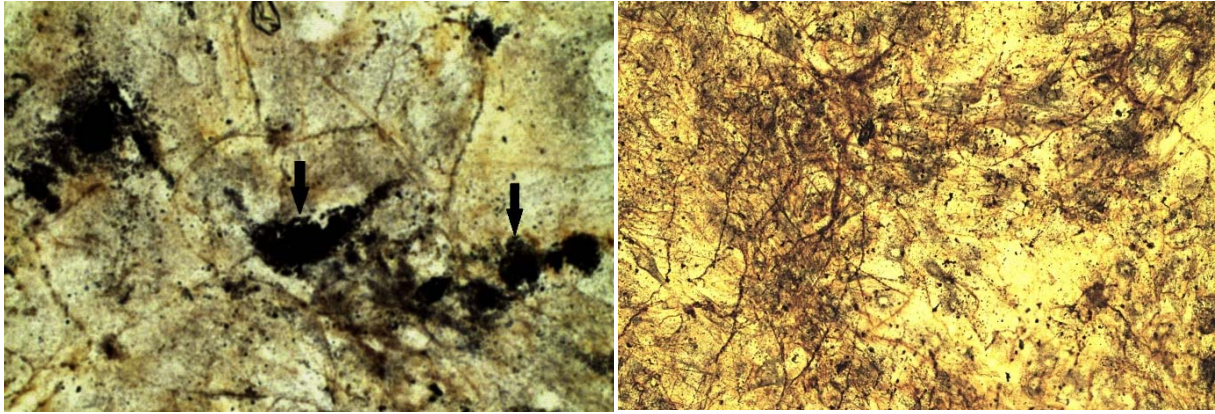


Abbildung 15 Differenzierung der IFN γ -Knockout-mASC: An Tag 14 zeigt die Differenzierung multiple Matrix-Mineralisationen (links, 40-fache Vergrößerung, durch Pfeil markiert)). In der Kontrolle (rechts, 10-fache Vergrößerung) sind keine Kalkeinlagerungen sichtbar.

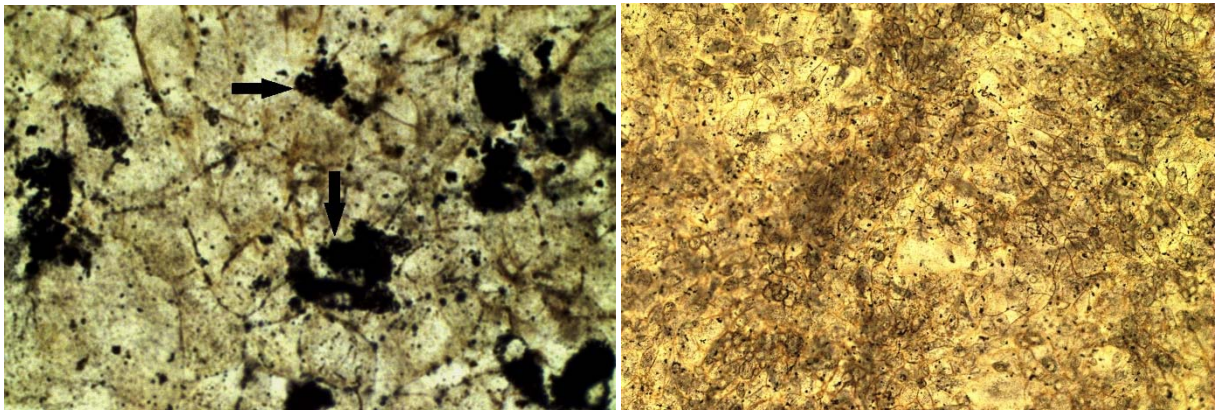


Abbildung 15 Differenzierung der Ptgs2-Knockout-mASC: An Tag 14 zeigt die Differenzierung multiple Matrix-Mineralisationen (links, 40-fache Vergrößerung, durch Pfeile markiert)). In der Kontrolle (rechts, 10-fache Vergrößerung) sind keine Kalkeinlagerungen sichtbar.

3.5. Knockout-ASC haben immunsupprimierende Wirkung

Um das Verständnis der Wirkung mesenchymaler Stammzellen zu verbessern, wurde die Abhängigkeit des immunsuppressiven Potentials von zwei verschiedenen Mediatoren immunologischer Prozesse untersucht. Der Einfluss der Gene für den Interferon γ -Rezeptor 1 (IFN γ -R1) und für die Cyclooxygenase 2 (Cyclooxygenase-Aktivität der Prostaglandin-Peroxid-Synthase-2) auf die Suppression der Proliferation der T-Lymphozyten, welche die Abstoßungsreaktion nach Organtransplantationen begründet, wurde erforscht. Zu diesem Zweck wurden ASC-Splenozyten-Kokulturen angefertigt, in denen eine konstante Zahl an durch CD 3-/CD 28-Antikörper aktivierten Lymphozyten steigenden Mengen an mesenchymalen Stammzellen ausgesetzt wurden. Durch die Abnahme des Farbstoffes CFSE in den Tochtergenerationen der proliferierenden Lymphozyten

kann die Fähigkeit der ASC, diese Proliferation zu unterdrücken, beurteilt werden. Die Ansätze wurden für 5 Tage bei 37°C inkubiert und anschließend mit Antikörpern gegen CD 3, einem Bestandteil des T-Zell-Rezeptors, gefärbt. Tote Zellen wurden durch Färbung mit PI aus der Auswertung entfernt. Es wurden ASC bis zur Passage 12 verwendet. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten aus 5 unabhängigen Versuchsreihen.

Sowohl die ASC aus Wildtyp-Mäusen als auch diejenigen mit genetisch veränderten Eigenschaften zeigten eine Unterdrückung der T-Zell-Proliferation in der MLR. Es zeigten jedoch zwischen den Zellen verschiedener Linien relevante Unterschiede, bis zu welchem Grad die Immunsuppression stattfand.

3.5.1. Immunsuppression durch Wildtyp-ASC

Wildtyp-ASC konnten in einem Verhältnis von 1:1 zu den responder-Lymphozyten die Proliferation auf 50% reduzieren. In einem Verhältnis von 3:4 proliferierten 55% der Lymphozyten, bei 1:2 waren es 64%. In höheren Verdünnungen wurde die Suppression der Lymphozyten erwartungsgemäß weniger: bei einer Verdünnung von bis zu 1:10 lag sie bei 70%, bei 1:20 proliferierten 79% der Lymphozyten. Die Kontroll-Lymphozyten ohne Zusatz von ASC proliferierten zu 87%, die Positiv-Kontrolle mit Concavalin A zu 96% und die Negativ-Kontrolle, die nur Lymphozyten enthielt, zu 17%. Die Ergebnisse der Wildtyp-ASC sind in Diagramm 1 grafisch dargestellt. Somit konnte die dosisabhängige Suppression der Proliferation einer lymphozytären Population durch mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe nachgewiesen werden.

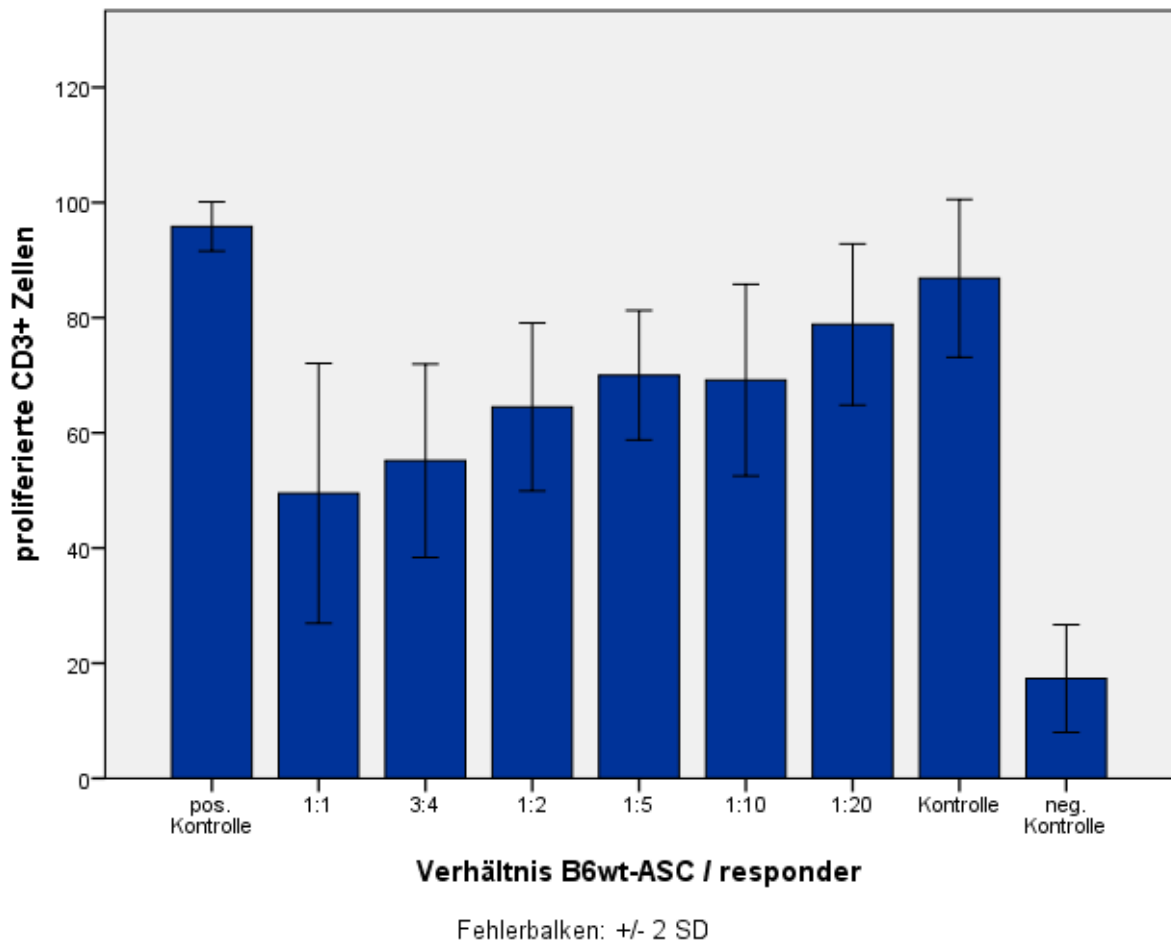


Diagramm 1 Ergebnis der MLR mit Wildtyp-ASC, Anteil der proliferierten CD 3+ Zellen wird in % angegeben. Positiv-Kontrolle mit Concavalin A, Responder (Balb/c-Lymphozyten) und mesenchymale Stammzellen in verschiedenen Verhältnissen, Negativ-Kontrolle mit nicht aktivierten Lymphozyten. Die Suppression der Lymphozyten-Proliferation beträgt bei einem Verhältnis von 1:1 50%, in einem Verhältnis von 3:4 55%, bei 1:2 64%, bei 1:5 70%, bei 1:10 69% und bei 1:20 79%. Aktivierte Lymphozyten ohne zugesetzte Stammzellen proliferieren zu 87% (Kontrolle), mit Concavalin A stimulierte Lymphozyten zu 96% (Positiv-Kontrolle) und nicht stimulierte Lymphozyten zu 17% (Negativ-Kontrolle).

3.5.2. Immunsuppression durch IFN γ -Knockout-ASC

IFN γ -Knockout-ASC unterdrückten die Vermehrung der Lymphozyten auf maximal 28% im Verhältnis von 1:1. Bei einer Mischung von 3:4 proliferierten 43%, bei 1:2 62% und bei bis zu 1:10 70% der eingesetzten responder-Lymphozyten. Wurden ASC und Lymphozyten in einem Verhältnis von 1:20 kombiniert, zeigten 84% der responder eine Zellteilung an. Die Kontrollen waren für alle Zelllinien dieselben. Die Mittelwerte der proliferierten Lymphozyten aus den MLRs und die Standardabweichungen für die Suppression durch IFN γ -Knockout-ASC sind in

Diagramm 2 dargestellt. In den Versuchen mit IFN γ -Knockout-ASC fallen hohe Standardabweichungen auf.

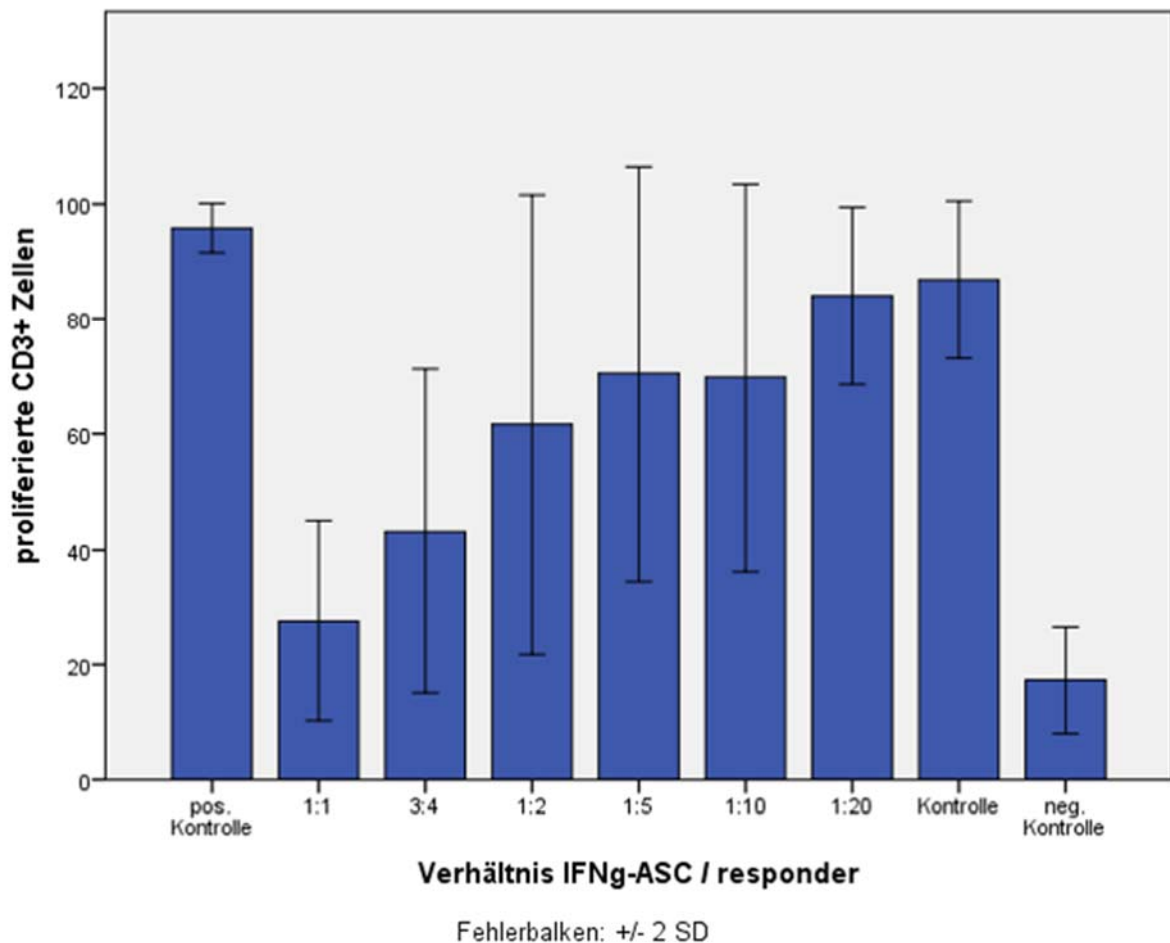


Diagramm 2 Ergebnis der Versuche mit IFN γ -Knockout-ASC, Anteil der proliferierten CD 3+ Zellen wird in % angegeben. Positiv-Kontrolle mit Concavalin A, Responder (Balb/c-Lymphozyten) und mesenchymale Stammzellen in verschiedenen Konzentrationen, Negativ-Kontrolle mit nicht aktivierten Lymphozyten. Die Suppression der Lymphozyten-Proliferation beträgt bei einem Verhältnis von 1:1 28%, in einem Verhältnis von 3:4 43%, bei 1:2 62%, bei 1:5 71%, bei 1:10 70% und bei 1:20 84%. Aktivierte Lymphozyten ohne zugesetzte Stammzellen proliferieren zu 87% (Kontrolle), mit Concavalin A stimulierte Lymphozyten zu 96% (Positiv-Kontrolle) und nicht stimulierte Lymphozyten zu 17% (Negativ-Kontrolle).

Im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen sind IFN γ -Knockout-ASC bei einer Konzentration von 1:1 signifikant suppressiver (p-Wert: 0,004). Die übrigen Kombinationen von ASC und Lymphozyten (3:4, 1:2, 1:5, 1:10, 1:20) zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellen ohne Interferon γ -Rezeptor und dem Wildtyp an.

3.5.3. Keine relevante Immunsuppression durch Ptgs2-Knockout-ASC

Die ASC der Ptgs-2-Knockout-Mäuse erreichten in der MLR im Durchschnitt eine Suppression der Lymphozyten-Proliferation von maximal 53% im Verhältnis von 1:1. In einem Verhältnis von 3:4 proliferierten 73% der Lymphozyten, bei bis zu 1:5 84%. In niedrigen Konzentrationen wie 1:10 und 1:20 konnten ASC dieser Linie die Zellteilung nur noch auf 88% respektive 89% hemmen. Die Ergebnisse der Versuche sind in Diagramm 3 zusammengefasst.

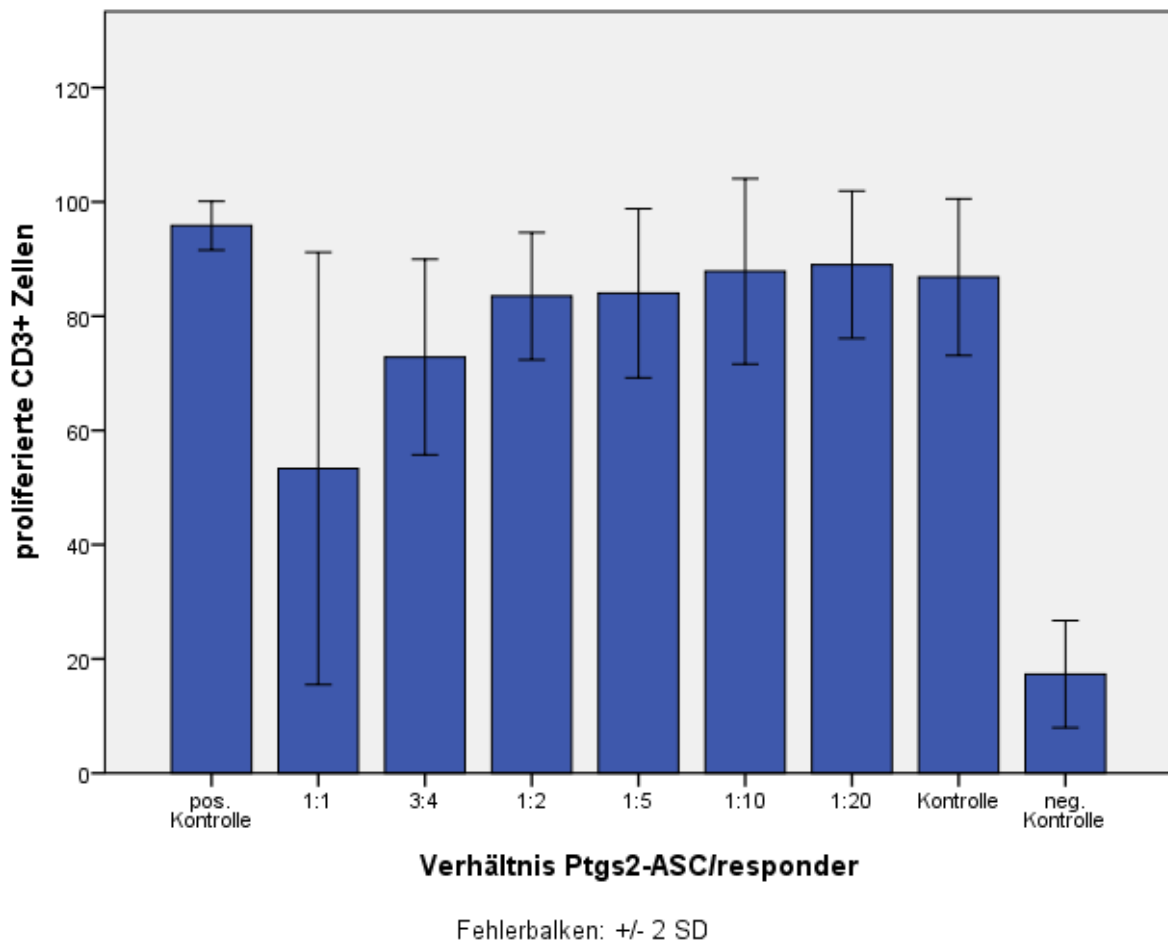


Diagramm 3 Ergebnis der MLR mit Ptgs2-Knockout-mASC, Anteil der proliferierten CD 3+ Zellen wird in % angegeben. Positiv-Kontrolle mit Concavalin A, Responder (Balb/c-Lymphozyten) und mesenchymale Stammzellen in verschiedenen Konzentrationen, Negativ-Kontrolle mit nicht aktivierten Lymphozyten. Die Suppression der Lymphozyten-Proliferation beträgt bei einem Verhältnis von 1:1 53%, in einem Verhältnis von 3:4 73%, bei 1:2 83%, bei 1:5 84%, bei 1:10 88% und bei 1:20 89%. Aktivierte Lymphozyten ohne zugesetzte Stammzellen proliferieren zu 87% (Kontrolle), mit Concavalin A stimulierte Lymphozyten zu 96%(Positiv-Kontrolle) und nicht stimulierte Lymphozyten zu 17% (Negativ-Kontrolle).

Ptgs2-Knockout-ASC sind nach diesen Ergebnissen im Vergleich zu jenen des Wildtyps weniger immunsupprimierend. Für das Verhältnis 1:1 kann keine

statistische Signifikanz erreicht werden (p-Wert 0,68). Alle weiteren Kombinationsverhältnisse zeigen einen signifikanten Unterschied (Signifikanz < 0,05) zwischen den ASC des Wildtyps und jenen der Ptgs-2-Knockout-Linie. Tabelle 5 zeigt die Signifikanz für die einzelnen Verhältnisse zwischen ASC und Lymphozyten.

Verhältnis	p-Wert
3:4	0,004
1:2	0,001
1:5	0,004
1:10	0,003
1:20	0,026

Tabelle 5 p-Werte für statistisch signifikante Unterschiede zwischen der immunsupprimierenden Fähigkeit der mesenchymalen Stammzellen der Wildtyp- und der Ptgs2-Knockout-Tiere.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe der drei untersuchten Zelllinien zwar immunsupprimierende Wirkungen haben, die Unterdrückung der Lymphozyten-Proliferation aber stark unterschiedlich ausfällt. Ptgs2-Knockout-ASC zeigten eine signifikant weniger ausgeprägte Suppression als die Zellen des Wildtyps, was auf eine elementare Bedeutung der Cyclooxygenase-2 für das immunsuppressive Potential der mesenchymalen Stammzellen spricht. IFN γ -Knockout-ASC waren im Verhältnis von 1:1 zu responder-Lymphozyten signifikant stärker immunsuppressiv, während sie in den restlichen Kombinationen keine Unterschiede zu den Wildtyp-Zellen zeigten.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde eine Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen aus Knock-out-Mäusen erarbeitet, welche entweder keinen Interferon- γ -Rezeptor oder keine Cyclooxygenase-2-Aktivität besitzen. Es konnte gezeigt werden, dass diese MSC ihrem Wildtyp-Stamm äquivalent in Zellkultur kultivierbar sind, dass sie weitestgehend dieselben Oberflächenmoleküle exprimieren und analog zu den Stammzellen ohne genetische Veränderung in verschiedene Zelltypen des Binde- und Stützgewebes differenzieren können. Die Lymphozyten-Proliferation nach Mitogen-Stimulation wird durch die mesenchymalen Stammzellen ohne den Interferon- γ -Rezeptor nicht wesentlich verändert. Stammzellen ohne die Fähigkeit zur Prostaglandin-Synthese durch die COX-2 sind signifikant weniger immunsupprimierend wirksam als diejenigen des Wildtyp-Stammes.

4.1. Zellkultur

Die für unsere Versuche gewonnenen Stammzellen wurden aus dem Fettgewebe entnommen. Dies ist eine anerkannte Quelle für mesenchymale Stammzellen [15]. Durch die Plastikadhärenz können ASC und MSC aus einer heterogenen Gruppe Zellen hinaus gefiltert werden [16]. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde wie in allen vergleichbaren Arbeiten Kollagenase zum Herauslösen der Zellen aus ihrer perivaskulären Nische verwendet [16]. In Zellkultur zeigten unsere Stammzellen unabhängig von ihrer genetischen Grundlage eine spindelförmige Gestalt mit langen, dünnen Ausläufern und kleinem, dunklem Zellkern [70].

In Versuchen von Crop et al. konnte gezeigt werden, dass mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe in normalen Kulturbedingungen ohne entzündliche Stimuli in einzelnen Schichten wachsen und gleichmäßig über den Boden der Zellkulturflasche verteilt sind [71]. Die ASC aus unseren Präparationen zeigten dieselben Charakteristika. Es kann somit anhand des Phänotyps von einer homogenen Population an ASC in unseren Versuchen ausgegangen werden. Zwischen den Wildtyp-Zellen und den genetisch modifizierten konnten keine morphologischen Unterschiede festgestellt werden. Es wurden zwar bereits verschiedene Knockout-ASC für Versuche verwendet [28, 30, 68], man findet jedoch in der Literatur wenige Berichte über die mikroskopische Erscheinung kultivierter Knock-out-ASC. Es ist in jedem Fall relevant festzuhalten, dass die IFN γ -ASC in unseren Versuchen nicht so rasch und zuverlässig proliferieren wie

die Zellen der Wildtyp- und der Ptgs2-Knockout-Tiere. Auch Herrera und Kollegen machten diese Erfahrung, als sie CD 44-Knockout-ASC kultivierten. Diese zeigten ein 50% langsames Wachstum als das der Wildtyp-Zellen [72]. Bortolotti et al beschrieben bei den murinen ASC ein 80% konfluentes Wachstum erst nach 10 Tagen, somit wesentlich langsamer als wir es in unseren Versuchen feststellen konnten [73].

4.2. Phänotypisierung

Die Charakterisierung der Oberflächenantigene der verschiedenen Stammzell-Linien erfolgte via Durchflusszytometrie von gefärbten ASC nach Kultivierung bis zu einem durchschnittlichen Alter von 9 Passagen. Insbesondere die aus dem Fettgewebe der IFN γ - und Ptgs-2-Knockout-Mäuse gewonnenen Stammzellen zeigten eine Expression von CD 34, einem klassischen hämatopoietischen Antigen. Auf den ASC der Wildtyp-Tiere ließ sich CD 34 nur schwach positiv nachweisen. Auf murinen ASC ist eine Expression von CD 34 nicht genau erforscht, es existieren Berichte über CD 34-positive murine ASC [74] und über CD 34-negative [73, 75]. Eine Abhängigkeit vom Ursprungsgewebe (Stammzellen aus dem Knochenmark sind CD 34-negativ, jene aus dem Fettgewebe positiv) wurde ebenfalls in den Raum gestellt [76].

Nach den aktuell geltenden „minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells“ [14] sollen humane MSC CD 105, CD 73 und CD 90 exprimieren und keine Expression von CD 34, CD 45R, CD 14, CD 11b, CD 79 α , CD 19 und HLA-DR aufweisen. Mehrere Studien zeigen bei der genaueren Beschreibung der mesenchymalen Stammzellen aus humanem Fettgewebe die Expression von CD 34 bei frisch gewonnenen ASC als durchaus vorkommendes Phänomen [16, 77, 78]. Im Laufe der Kultivierung wird eine Verminderung der Expression von CD 34 durch die ASC und ein zeitgleiches Zunehmen der typischen Stammzellmarker (CD 29, CD 73, CD 90) beschreiben [16]. Es existieren jedoch auch Studien an humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe, die keine CD 34-Expression aufweisen [75]. Somit kann man festhalten, dass eine definitive Aussage über das Antigen CD 34 auf mesenchymalen Stammzellen sowohl beim Menschen als auch auf murinen Zellen aktuell nicht möglich ist und weitere Forschung auf diesem Gebiet notwendig ist. Unklar bleibt ebenfalls, warum auf den

für diese Arbeit verwendeten Wildtyp-Zellen CD 34 nur sehr schwach positiv nachweisbar war.

CD 34 ist umso länger auf den ASC nachweisbar, je langsamer die Proliferation der Zellen voranschreitet [16]. Somit bietet eine langsame Proliferationsrate einen möglichen Erklärungsansatz, warum die hier verwendeten Zellen auch nach 9 Passagen dieses Molekül exprimieren. Die CD 34-positiven ASC in der Studie von Maumus und Kollegen waren in der Lage zu Osteoblasten und Adipozyten zu differenzieren. Dies weist auf die Fähigkeit dieser Zellen hin, sich in verschiedene Stützgewebe zu entwickeln und zeigt, dass das Vorkommen eines hämatopoietischen Antigens keine Einschränkung dieser wichtigen Stammzellfunktion ist.

Weiterhin konnte auf den verwendeten Stammzellen CD 44 nachgewiesen werden. Auch dieses Adhäsionsmolekül, welches die Bindung an Hyaluronsäure vermittelt und einer Vielzahl an Zellen zum Homing verhilft [17, 79] entspricht nicht einem klassischen Antigen der mesenchymalen Stammzellen. Dennoch ist sein Auftreten auf sowohl humanen als auch murinen MSC beschrieben [72, 73, 75, 79].

CD 90 wird von der ISCT als eines der wichtigsten Moleküle einer mesenchymalen Stammzelle des Menschen angesehen. Die murinen Stammzellen in den durchgeführten Versuchen exprimierten das äquivalente CD 90.1 nicht. Es wurde in einer Arbeit von Peister et al an untersuchten Stammzellen aus murinem Gewebe ebenfalls kein CD 90 gefunden [74]. Andere Studien können CD 90 nachweisen [73, 75].

Die nicht erwarteten Oberflächenmoleküle für die hier genutzten Zellen (H2Kb, H2Kd, MHC-II, CD 11b, CD 11c, CD 19, CD 31, CD 45R, CD 117, PD-1) waren unabhängig von der genetischen Grundlage bei allen unseren Zellen nicht identifizierbar. Diese Ergebnisse stehen damit im Einklang mit den Definitionskriterien der ISCT [14]

4.3. Differenzierung

Unabhängig von ihrer genetischen Grundlage konnte bei allen verwendeten Zelllinien eine Differenzierung zu Adipozyten und Osteoblasten induziert werden. Dieses pluripotente Potential wird als wesentliche Grundvoraussetzung dafür

gewertet, dass eine Kultivierung mesenchymaler Stammzellen erfolgreich ist [14]. Unabhängig von Ursprungsgewebe und Isolierungsprotokoll konnten Bortolotti et al eine Differenzierung bei drei verschiedenen Präparationen von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark oder aus dem Fettgewebe nachweisen [73]. Wie schon in 4.2 erwähnt, konnte an humanen ASC eine Differenzierung zu Adipozyten und Osteoblasten nur in der CD 34-positiven Fraktion der Zellen aus der SVF beobachtet werden [16]. In den durchgeführten Versuchen differenzierten auch die nur schwach CD 34-positiven Wildtyp-ASC. Das macht eine grundlegende Rolle des CD 34 für die Differenzierung in Binde- und Stützgewebe unwahrscheinlich. Humane mesenchymale Stammzellen können in einer inflammatorischen Umgebung in Adipozyten und Osteoblasten differenzieren [71]. Die Umstände der vorangegangenen Kultivierung haben demnach keinen Einfluss auf das Differenzierungspotential. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass auch murine CD 44-Knockout-MSC keinerlei Einschränkung in ihrer Fähigkeit zur Gewebespezialisierung aufweisen [72].

Die stabile Differenzierung in Zellen des Bindegewebes unabhängig von ausgehenden Materialien, Isolationsmechanismen und genetischer Grundlage der mesenchymalen Stammzellen kann vielversprechende Einsätze in der regenerativen Medizin möglich machen. Weiterhin zeigt dieses Charakteristikum die Zuverlässigkeit der verwendeten MSC/ASC an und kann als Screening-Methode zum Überprüfen der Stammzellfunktion dienen.

4.4. Immunsuppressives Potential

In den angewendeten Versuchen wurden Mitogen-aktivierte (durch anti-CD 3/CD 28-Antikörper) Splenozyten für 5 Tage entweder mit ASC aus Wildtyp-Zellen, IFN γ -Knockout-ASC oder mit Ptgs2-Knockout-Zellen kultiviert. Es konnte gezeigt werden, dass IFN γ -Knockout-ASC im Verhältnis 1:1 eine stärker immunsupprimierende Wirkung aufweisen als jene des Wildtyp-Stammes. ASC ohne COX-2 waren signifikant weniger hemmend auf Splenozyten wirksam.

4.4.1. Interferon- γ -Knockout-ASC

Es konnte in den hier durchgeführten Versuchen gezeigt werden, dass IFN γ -Knockout-ASC in Kultur mit Mitogen-aktivierten Splenozyten für 5 Tage eine Suppression der Zellteilung bewirken können, die größtenteils auf dem gleichen Niveau liegt wie jene von Wildtyp-ASC. In hoher Konzentration supprimierten IFN γ -

negative Zellen sogar effektiver als genetisch unveränderte. Dieser Effekt erreichte statistische Signifikanz.

Eine schematische Darstellung der Wirkung der Interferon- γ -Knockout-ASC aus dieser Arbeit ist in Abbildung 17 gezeigt. Zum Vergleich zeigt Abbildung 18 die Wirkung von Wildtyp-ASC.

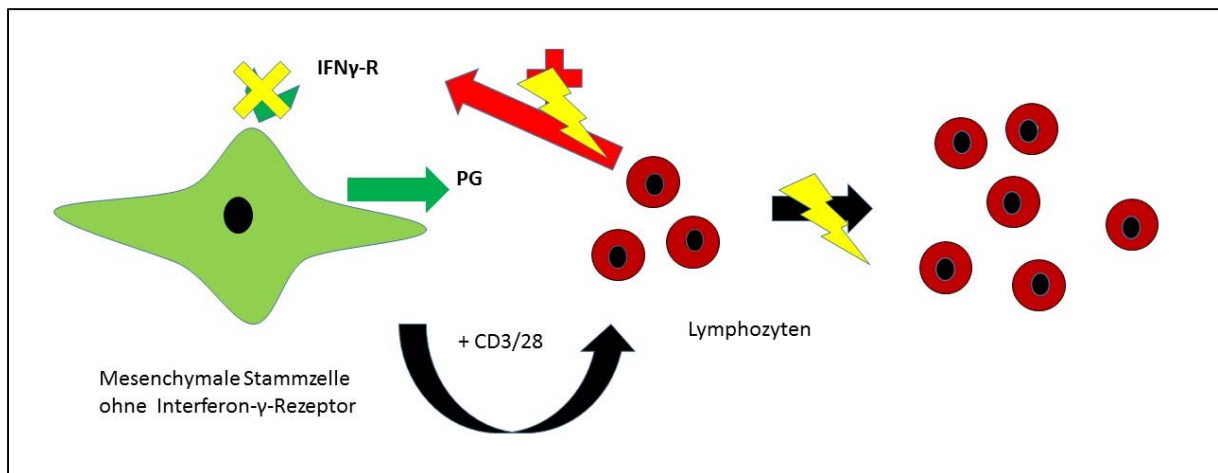


Abbildung 16 Mesenchymale Stammzellen ohne Rezeptor für Interferon- γ können nicht durch dieses Molekül aktiviert werden. Dennoch führen sie zu relevanter Suppression von durch CD 3/CD 28 aktivierten Splenozyten. Diese immunsupprimierende Fähigkeit ist mit jener durch Wildtyp-Zellen vergleichbar.

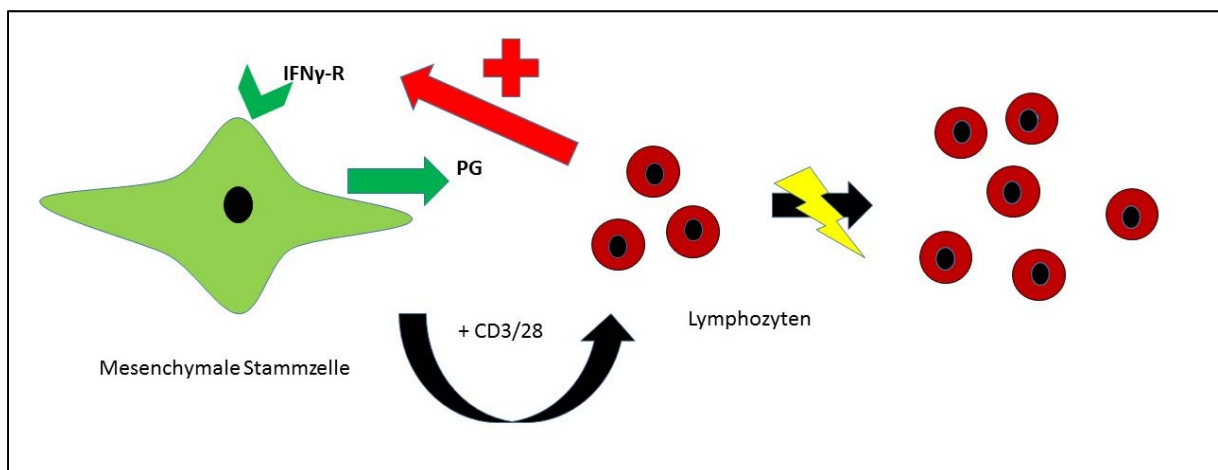


Bild 17 Mesenchymale Stammzellen ohne genetische Veränderung werden durch Interferon- γ aktiviert und können in der Folge die durch CD 3/CD 28 induzierte Proliferation von Splenozyten hemmen. Möglicherweise geschieht dies durch von den MSC produziertes Prostaglandin.

Die erhobenen Daten stehen somit nicht im Einklang mit erwarteten Ergebnissen und den Resultaten anderer Forschungsgruppen. IFN γ -Knockout-ASC waren in Versuchen zur Auswirkung proinflammatorischer Zytokine auf das immunsuppressive Potential der MSC nicht zur Hemmung der Lymphozyten-Proliferation fähig [28]. Außerdem konnte in derselben Versuchsreihe gezeigt werden, dass ohne T-Zell-Zytokine keine Immunsuppression durch mesenchymale Stammzellen stattfinden kann und IFN γ das Schlüssel-Zytokin darstellt. Weiterhin konnten Antikörper gegen IFN γ die erreichte Proliferationssuppression von Lymphozyten durch Wildtyp-Stammzellen aufheben [26, 80]. ASC, die vor einer Kultivierung mit Lymphozyten exogenem IFN γ ausgesetzt waren, konnten die Proliferation signifikant stärker einschränken als nicht aktivierte ASC [71]. Ein Hinweis auf einen anderen molekularen Weg ist die nicht durch MSC-Infusion beeinflussbare IFN γ -Konzentration in einem Modell der Sepsis [30].

Eine IFN γ -Produktion wird zur Induktion der Immunsuppression durch ASC benötigt, nach initialer Aktivierung durch dieses Molekül wird die Produktion desselben in Anwesenheit von MSC signifikant eingeschränkt (Ren et al. 2008; Aggarwal 2005). Das genaue Ausmaß des benötigten IFN γ bleibt somit unklar. Eine mögliche Erklärung für die Wirksamkeit unserer IFN γ -Knockout-ASC könnte sein, dass Möglichkeiten bestehen, die ASC über andere Zytokine zur Immunsuppression zu aktivieren. In der Splenozyten-Fraktion sind auch Antigen-präsentierende Zellen enthalten, deren IL-1 Produktion zur Aktivierung der MSC beitragen kann [28]. Eine Aktivierung ohne IFN γ und somit „nur“ durch TNF α und IL-1 wurde bisher nicht beschrieben [28], es werden IFN γ und entweder IL1 α , IL1 β oder TNF α benötigt. Möglicherweise ist jedoch eine Aktivierung über IL-1 aus APC ein Ansatzpunkt, durch den die antiproliferative Wirkung der ASC ohne IFN γ -Rezeptor erklärt werden kann. Für den Nachweis dieser Hypothese müssen weitere Versuche durchgeführt werden, beispielsweise an Knockout-ASC ohne TNF α - oder IL1-Rezeptor. Durch simultanes Einsetzen von solchen ASC in lymphozytäre Kokulturen könnte auf die jeweilige Relevanz für die MSC-Immunsuppression geschlossen werden.

Weiterhin muss festgestellt werden, dass insbesondere bei den IFN γ -Knockout-ASC sehr hohe Standardabweichungen in den Ergebnissen bestehen. Somit kann

durch die relative Streuung der Ergebnisse nur ein Trend für die Relevanz von Interferon- γ in der MSC-vermittelten Immunsuppression aufgezeigt werden.

4.4.2. Ptgs2-Knockout-ASC

Mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe von Mäusen ohne funktionstüchtige Cyclooxygenase-2 konnten in den Versuchen dieser Arbeit nur im Verhältnis 1:1 mit den Mitogen-aktivierten Splenozyten eine Immunsuppression von 50% erreichen. Die weiteren Verhältnisse zwischen ASC und SC zeigten eine signifikant abgeschwächte antiproliferative Wirkung der ASC. Durch Annäherung an die Positiv-Kontrolle mit durch Concavalin-A stimulierten Splenozyten lässt sich festhalten, dass ASC ohne Fähigkeit zur Prostaglandin-Synthese nicht immunsuppressiv wirksam sind. Die Auswirkung des Fehlens von Cyclooxygenase-2 ist in Abbildung 19 grafisch dargestellt.

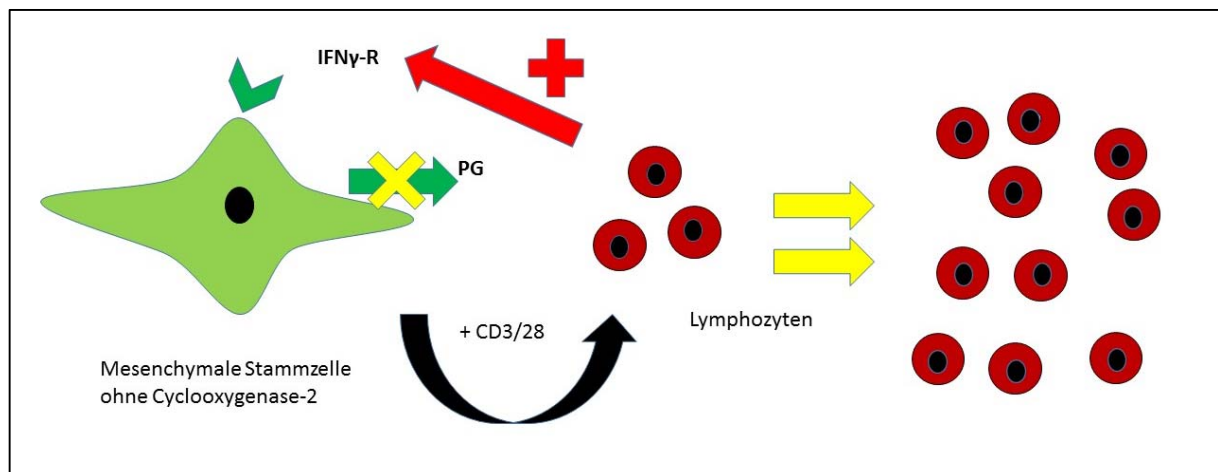


Bild 18 Mesenchymale Stammzellen mit genetisch veränderter Ptgs2 und somit ohne Prostaglandin-Synthese-Funktion können die CD 3/CD 28 getriggerte Proliferation von Splenozyten nicht unterdrücken. Die Aktivierung über IFN γ ist bei diesen Zellen intakt. Vergleich hierzu bitte auch Abbildung 18 (Wirkung der Wildtyp-Zellen).

Diese Ergebnisse spiegeln wider, was durch andere Forschungsgruppen in der Vergangenheit zu diesem Thema bereits publiziert wurde. In Versuchsreihen zur Hemmung der Mastzellfunktion konnte gezeigt werden, dass COX-2-defiziente MSC im Gegensatz zu Wildtyp-Zellen die Zytokinproduktion und Degranulation nicht unterdrücken können [68]. ASC, die durch Kultur in einer MLR einem entzündlich veränderten Medium ausgesetzt waren, zeigten eine um das 10-fach verstärkte Expression der COX-2 auf [71]. In derselben Versuchsreihe wurde

gezeigt, dass ein Zytokin-Cocktail aus IFN γ , TNF α und IL-6 nicht zur Hochregulation der COX-2 in der Lage ist. Im Widerspruch dazu konnte exogen zu MSC hinzugefügtes IFN γ und TNF α sowie das Aussetzen der MSC in einer Lymphozyten-Kultur eine vermehrte Expression der Cyclooxygenase-2 und eine erhöhte Prostaglandin-E2-Produktion bewirken [62, 66, 81]. Eine konstitutive Expression der COX-2 auf mesenchymalen Stammzellen wird durch verschiedene Forschungsgruppen beschrieben [62, 66]. Ein weiteres Argument für die Beteiligung der COX-2 in der Entstehung des immunsuppressiven Potentials der ASC ist, dass durch Hemmung der Cyclooxygenase die Proliferation der Lymphozyten wieder hergestellt werden konnte [62, 66, 81]. Auch hier finden sich Ergebnisse anderer Forscher, die diesen Effekt nicht nachweisen konnten [28]. Somit bestehen zwar in bisherigen Forschungsergebnissen Widersprüche darüber, ob und in welchem Ausmaß die Cyclooxygenase-2 und ihr Produkt PG-E2 dazu beitragen, dass mesenchymale Stammzellen immunsupprimierend wirksam sind. Die Mehrzahl der Versuche deutet aber auf eine Schlüsselfunktion von durch MSC hergestellte Prostaglandine hin. Diese essentielle Funktion kann durch unsere Versuchsergebnisse weiter bekräftigt werden.

Es existiert weiterhin die Hypothese, dass Stickstoffmonoxid (NO) die immunsuppressive Wirkung von MSC vermittelt [28]. Im Verhältnis 1:1 mit den responder-Lymphozyten konnten die COX-2-defizienten ASC eine den Wildtyp-Zellen entsprechende Immunsuppression auslösen. Es liegt nahe, dass eine Beteiligung des Zell-Zell-Kontakts für diesen Effekt mitverantwortlich ist und durch einen lokal wirksamen Mediator vermittelt wird. Eine Studie mit der zeitgleichen Hemmung von NO und PG-E2 in verschiedenen Stufen könnte Aufschluss darüber bringen, ob die beiden Substanzen gleichwertig für die Immunsuppression verantwortlich sind und ob sie zur weiteren Steigerung des antiproliferativen Effekts in der Lage sind, synergistisch zu wirken.

4.5. Ausblick

Weitere Forschung wird notwendig sein, um die genauen Mechanismen zu verstehen, durch die mesenchymale Stammzellen wirksam sind. Die Rolle der einzelnen Zytokine und Immunregulatoren ist bisher noch unklar. Dies kann durch die Vielzahl an Ergebnissen bedingt sein, die an Zellen verschiedener menschlicher oder muriner Gewebe (Fett-, Nabelschnur-, Knochenmarkgewebe)

[66, 75, 80] und durch unterschiedliche Kultivierungsmethoden [73] erhoben werden. Da bei Mensch und Maus verschiedene Moleküle zur Aktivierung der MSC notwendig sind (beim Menschen reicht IFN γ , murine Zellen benötigen IFN γ und TNF α oder IL-1 [28, 80]), ist eine ausschließliche Erforschung der molekularen Mechanismen an humanen Stammzellen für die klinische Anwendbarkeit in Erwägung zu ziehen. Weiterhin zeigen in vitro-Methoden nur einen kleinen Aspekt der Auswirkung einer zellulären Therapie an, da sie im Vergleich zum lebenden Organismus eine starke Vereinfachung darstellen. Insbesondere im Hinblick auf die Anwendung im Bereich der Immunsuppression nach der Transplantation solider Organe muss eine realistische Einschätzung der Reaktion des gesamten Organismus auf mesenchymale Stammzellen gegeben sein.

Weiterhin ergeben sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit konkrete Fragen, die zukünftige Grundlagenforschung beantworten sollte:

1. Ist die Bezeichnung von CD 34 als Marker hämatopoietischer Stammzellen noch zeitgemäß, wenn dieses Molekül regelmäßig durch verschiedene Studien auf mesenchymalen Stammzellen gefunden werden kann?
2. Existieren Wege, die zu einer Interferon- γ -unabhängigen Aktivierung von MSC führen und bis zu welchem Ausmaß können sich diese Mechanismen gegenseitig beeinflussen? Zur Beantwortung dieser Frage wäre die Erforschung der Reaktion von ASC auf IFN γ -defiziente Lymphozyten interessant.
3. Kann die Wirkung der mesenchymalen Stammzellen durch Erhöhung der angewendeten Zellzahl gesteigert werden? Wenn ja, ist dieser Effekt ausschließlich von NO abhängig?

5. Zusammenfassung

Eine Vielzahl an Ursachen kann dazu führen, dass ein Organ so stark geschädigt wird, dass langfristiges Überleben nicht möglich ist. Eine Transplantation ist in diesem Fall für den Patienten die einzige langfristige Möglichkeit, ein annähernd normales Leben zu führen. Mesenchymale Stammzellen, vor über 30 Jahren im Knochenmark entdeckt, können einen starken immunsuppressiven Effekt ausüben. Wenn die Wirkmechanismen von diesen Zellen ausreichend dargestellt und verstanden sind, kann die zelluläre Immuntherapie einen Beitrag zur Reduktion der Dosen von klassischen Immunsuppressiva leisten. Diese sind mit vielfältigen Nebenwirkungen vergesellschaftet.

In der vorliegenden Dissertation wurde eine Charakterisierung muriner mesenchymaler Stammzellen erarbeitet, die durch molekulargenetischen Knock-out entweder keinen Interferon- γ -Rezeptor oder keine funktionstüchtige Cyclooxygenase-2 besitzen. Damit sollen die Mechanismen, die zur Immunsuppression dieser Zellreihe führen, besser verstanden werden. Die Knockout-Zellen wurden im Hinblick auf ihr Wachstum in Zellkultur, ihren Immunphänotyp, ihr Differenzierungsverhalten in verschiedene Stützgewebe und ihr immunsuppressives Verhalten mit Stammzellen aus Wildtyp-Mäusen verglichen. Die erfolgte genetische Veränderung wurde mittels PCR kontrolliert. Nach Präparation aus dem Fettgewebe konnte bei allen untersuchten Zellen ein zuverlässiges Zellwachstum unter normalen Kulturbedingungen beobachtet werden. Die Interferon- γ - und die Cyclooxygenase-2-Knockout-ASC präsentierten denselben Immunphänotyp wie die Wildtyp-Stammzellen, mit dem Unterschied, dass sie eine deutlichere Expression des CD 34 aufzeigen. Von einem Auftreten dieses Antigens hämatopoietischer Stammzellen auf MSC, die aus dem Fettgewebe kultiviert werden, wird von mehreren Forschungsgruppen berichtet. Unter verschiedenen Differenzierungsstimuli entwickelten alle untersuchten Zellen eine Einlagerung von Fettvakuolen und zeigten Mineralisationen von Kalkkristallen. Dies gilt als Beweis ihrer Fähigkeit, sich in Unterformen des Binde- und Stützgewebes zu entwickeln. Unter Kultur mit Mitogen-aktivierten Splenozyten konnten die ASC des Wildtyp-Stammes eine dosisabhängige Immunsuppression auslösen. Eine gleichwertige, in einzelnen Verhältnissen sogar stärkere Hemmung der Proliferation der Lymphozyten konnte durch die IFN γ -Knockout-ASC erreicht

werden, so dass davon ausgegangen werden muss, dass auch ohne funktionstüchtigen Rezeptor für dieses Zytokin eine Aktivierung der mesenchymalen Stammzellen möglich sein kann. Ohne Cyclooxygenase-2 ließ sich nur im Verhältnis 1:1 eine Hemmung der Zellteilung der Responder-Zellen zeigen. Alle anderen Proben waren im Vergleich zu den Wildtyp-Stammzellen nicht signifikant immunsuppressiv. Eine essentielle Rolle der Prostaglandine für die hemmende Wirkung von mesenchymalen Stammzellen auf die Proliferation von Lymphozyten und anderen Zellen des Immunsystems wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit deutlich gemacht. Dennoch ist aufgrund der Vielzahl der Untersuchungen und verschiedener Modelle zur Klärung der molekularen Mechanismen, durch die mesenchymale Stammzellen ihre Wirkung entfalten, eine eindeutige Einordnung der Resultate als äußerst schwierig einzuschätzen. Es werden vielfältige weitere Versuchsreihen notwendig sein, um das genaue Zusammenspiel von Zytokinen, Chemokinen, Immunzellen, Stammzellen und am Ende des gesamten Organismus zu verstehen, bevor ASC eine breite Anwendung am Patienten finden können.

6. Danksagung

Für die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit möchte ich einigen Menschen danken, die mir immer tatkräftig zur Seite standen und die Versuche und die Auseinandersetzung mit dem komplexen Thema möglich gemacht haben.

Allen voran geht mein herzlicher Dank an Prof. Dr. med. Marc Dahlke, dessen wunderbarer Rat, Ideen und immerwährende Motivation essentiell für den Fortschritt und Erfolg dieser Arbeit war. Außerdem danke ich Assistant Prof. Dr. Nataša Obermajer herzlich für ihre kreative Herangehensweise an wissenschaftliche Fragestellungen und ihre Begeisterung, mir bei Problemen weiterzuhelfen. Mein Dank gilt auch Yorick Söder und PD Dr. med. Dipl. inf. Felix C. Popp, die stets bereitstanden, wenn es Fragen gab.

Ich danke allen Mitarbeitern im Labor der Universitätsklinik Regensburg für ihre freundliche und kompetente Einarbeitung in die Strukturen, Abläufe und Geräte sowie den Rückhalt bei Problemen. Insbesondere geht mein Dank an Irina Kuçuk und Teresa Mark für ihre allzeitige, tatkräftige und einzigartige Unterstützung und herzliche Aufnahme in das Team der AG Dahlke.

Weiterhin haben mich meine Familie und Freunde in der Forschungszeit immer unterstützt, diesen Rückhalt schätze ich sehr und bin unendlich dankbar für ein gut funktionierendes Umfeld. Insbesondere möchte ich meiner technisch begabten Familie für den Intensivkurs im Umgang mit Microsoft Office und Excel danken.

7. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, Januar 2017

8. Literaturverzeichnis

- [1] Nombela-Arrieta, C.; Ritz, J.; Silberstein, L. E.: The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. In: Nature Reviews Molecular Cell Biology 12 (2011) 2, S. 126–31.
- [2] Eurotransplant: Kennzahlen 2014.
URL: https://www.eurotransplant.org/cms/index.php?page=pat_germany.
- [3] Bundesverband für Gesundheitsinformation und Verbraucherschutz: Info Organtransplantation. Notwendigkeit, Zeitpunkt, Risiken. URL: <http://www.bgv-transplantation.de/entscheidung.html#notw>.
- [4] Eggenhofer, E.: Mesenchymal stem cells in organ and tissue transplantation: one for all seasons? In: Current Opinion in Organ Transplantation 18 (2013) 1, S. 22–23.
- [5] Bundesverband für Gesundheitsinformation und Verbraucherschutz - Info Gesundheit e.V.: Info Organtransplantation - Optimale Immunsuppression. URL: <http://www.bgv-transplantation.de/immunsuppression.html>. Abrufdatum 21.07.2015.
- [6] Beyer Nardi, N.; da Silva Meirelles, L.: Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. In: Handbook of experimental pharmacology (2006) 174, S. 249–82.
- [7] Land, W. G.: Immunsuppressive Therapie. Stuttgart 2006.
- [8] European Medicines Agency: Simulect (Basiliximab).
- [9] López, M. M.; Valenzuela, J. E.; Alvarez, F. C.; López-Alvarez, M. R.; Cecilia, G. S.; Paricio, P. P.: Long-term problems related to immunosuppression. In: Transplant Immunology 17 (2006) 1, S. 31–35.
- [10] Urbán, V. S.; Kiss, J.; Kovács, J.; Gócza, E.; Vas, V.; Monostori, E.; Uher, F.: Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. In: Stem cells (Dayton, Ohio) 26 (2008) 1, S. 244–53.
- [11] European Medicines Agency: Rapamune, INN-Sirolimus.
- [12] Dahlke, M. H.; Hoogduijn, M.; Eggenhofer, E.; Popp, F. C.; Renner, P.; Slowik, P.; Rosenauer, A.; Piso, P.; Geissler, E. K.; Lange, C.; Chabannes, D.; Mazzanti, B.; Bigenzahn, S.; Bertolino, P.; Kunter, U.; Introna, M.; Rambaldi, A.; Capelli, C.; Perico, N.; Casiraghi, F.; Noris, M.; Gotti, E.; Seifert, M.; Saccardi, R.; Verspaget, H. W.; van Hoek, B.; Bartholomew, A.; Wekerle, T.; Volk, H. D.; Remuzzi, G.; Deans, R.; Lazarus, H.; Schlitt, H. J.; Baan, C. C.: Toward MSC in Solid Organ Transplantation: 2008 Position Paper of the MISOT Study Group. In: Transplantation 88 (2009) 5, S. 614–19.
- [13] Popp, F. C.; Slowik, P.; Eggenhofer, E.; Renner, P.; Lang, S. A.; Stoeltzing, O.; Geissler, E. K.; Piso, P.; Schlitt, H. J.; Dahlke, M. H.: No Contribution of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells to Liver Regeneration in a Rat Model of Prolonged Hepatic Injury. In: STEM CELLS 25 (2007) 3, S. 639–45.
- [14] Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D. S.; Deans, R. J.; Keating, A.; Prockop, D. J.; Horwitz, E. M.: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. In: Cytotherapy 8 (2006) 4, S. 315–17.

- [15] Zuk, P. A.; Zhu, M.; Ashjian, P.; De Ugarte, Daniel A; Huang, J. I.; Mizuno, H.; Alfonso, Z. C.; Fraser, J. K.; Benhaim, P.; Hedrick, M. H.: Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. In: *Molecular biology of the cell* 13 (2002) 12, S. 4279–95.
- [16] Maumus, M.; Peyrafitte, J.-A.; D'Angelo, R.; Fournier-Wirth, C.; Bouloumié, A.; Casteilla, L.; Sengenès, C.; Bourin, P.: Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. In: *International Journal of Obesity* 35 (2011) 9, S. 1141–53.
- [17] Schütt, C.; Bröcker, B.: *Grundwissen Immunologie*, 2. Aufl. Heidelberg 2009.
- [18] English, K.: Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. In: *Immunology and Cell Biology* 91 (2012) 1, S. 19–26.
- [19] Bartholomew, A.; Sturgeon, C.; Siatskas, M.; Ferrer, K.; McIntosh, K.; Patil, S.; Hardy, W.; Devine, S.; Ucker, D.; Deans, R.; Moseley, A.; Hoffman, R.: Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. In: *Experimental hematology* 30 (2002) 1, S. 42–48.
- [20] Dazzi, F.; Lopes, L.; Weng, L.: Mesenchymal stromal cells: a key player in 'innate tolerance'? In: *Immunology* 137 (2012) 3, S. 206–13.
- [21] Ortiz, L. A.; Gambelli, F.; McBride, C.; Gaupp, D.; Baddoo, M.; Kaminski, N.; Phinney, D. G.: Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (2003) 14, S. 8407–11.
- [22] Schraufstatter, I. U.; Discipio, R. G.; Zhao, M.; Khaldoyanidi, S. K.: C3a and C5a are chemotactic factors for human mesenchymal stem cells, which cause prolonged ERK1/2 phosphorylation. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182 (2009) 6, S. 3827–36.
- [23] Ponte, A. L.; Marais, E.; Gallay, N.; Langonné, A.; Delorme, B.; Hérault, O.; Charbord, P.; Domenech, J.: The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25 (2007) 7, S. 1737–45.
- [24] Carrero, R.; Cerrada, I.; Lledó, E.; Dopazo, J.; García-García, F.; Rubio, M.-P.; Trigueros, C.; Dorronsoro, A.; Ruiz-Sauri, A.; Montero, J. A.; Sepúlveda, P.: IL1 β induces mesenchymal stem cells migration and leucocyte chemotaxis through NF- κ B. In: *Stem cell reviews* 8 (2012) 3, S. 905–16.
- [25] Roddy, G. W.; Oh, J. Y.; Lee, R. H.; Bartosh, T. J.; Ylostalo, J.; Coble, K.; Rosa, R. H.; Prockop, D. J.: Action at a distance: systemically administered adult stem/progenitor cells (MSCs) reduce inflammatory damage to the cornea without engraftment and primarily by secretion of TNF- α stimulated gene/protein 6. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 29 (2011) 10, S. 1572–79.
- [26] Krampera, M.; Cosmi, L.; Angeli, R.; Pasini, A.; Liotta, F.; Andreini, A.; Santarlaschi, V.; Mazzinghi, B.; Pizzolo, G.; Vinante, F.; Romagnani, P.; Maggi, E.; Romagnani, S.; Annunziato, F.: Role for Interferon- γ in the Immunomodulatory Activity of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. In: *STEM CELLS* 24 (2006) 2, S. 386–98.

- [27] Polchert, D.; Sobinsky, J.; Douglas, G. W.; Kidd, M.; Moadsiri, A.; Reina, E.; Genrich, K.; Mehrotra, S.; Setty, S.; Smith, B.; Bartholomew, A.: IFN- γ activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. In: *European Journal of Immunology* 38 (2008) 6, S. 1745–55.
- [28] Ren, G.; Zhang, L.; Zhao, X.; Xu, G.; Zhang, Y.; Roberts, A. I.; Zhao, R. C.; Shi, Y.: Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide. In: *Cell Stem Cell* 2 (2008) 2, S. 141–50.
- [29] Opitz, C. A.; Litzenburger, U. M.; Lutz, C.; Lanz, T. V.; Tritschler, I.; Köppel, A.; Tolosa, E.; Hoberg, M.; Anderl, J.; Aicher, W. K.; Weller, M.; Wick, W.; Platten, M.: Toll-like receptor engagement enhances the immunosuppressive properties of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by inducing indoleamine-2,3-dioxygenase-1 via interferon-beta and protein kinase R. In: *Stem cells* (Dayton, Ohio) 27 (2009) 4, S. 909–19.
- [30] Németh, K.; Leelahavanichkul, A.; Yuen, Peter S T; Mayer, B.; Parmelee, A.; Doi, K.; Robey, P. G.; Leelahavanichkul, K.; Koller, B. H.; Brown, J. M.; Hu, X.; Jelinek, I.; Star, R. A.; Mezey, É.: Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E2-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. In: *Nature Medicine* 15 (2008) 1, S. 42–49.
- [31] Glennie, S.; Soeiro, I.; Dyson, P. J.; Lam, E. W.-F.; Dazzi, F.: Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. In: *Blood* 105 (2005) 7, S. 2821–27.
- [32] Ghannam, S.; Pene, J.; Torcy-Moquet, G.; Jorgensen, C.; Yssel, H.: Mesenchymal Stem Cells Inhibit Human Th17 Cell Differentiation and Function and Induce a T Regulatory Cell Phenotype. In: *The Journal of Immunology* 185 (2010) 1, S. 302–12.
- [33] Duffy, M. M.; Pindjakova, J.; Hanley, S. A.; McCarthy, C.; Weidhofer, G. A.; Sweeney, E. M.; English, K.; Shaw, G.; Murphy, J. M.; Barry, F. P.; Mahon, B. P.; Belton, O.; Ceredig, R.; Griffin, M. D.: Mesenchymal stem cell inhibition of T-helper 17 cell- differentiation is triggered by cell-cell contact and mediated by prostaglandin E2 via the EP4 receptor. In: *European Journal of Immunology* 41 (2011) 10, S. 2840–51.
- [34] Franquesa, M.; Hoogduijn, M. J.; Bestard, O.; Grinyó, J. M.: Immunomodulatory Effect of Mesenchymal Stem Cells on B Cells. In: *Frontiers in Immunology* 3 (2012).
- [35] Asari, S.; Itakura, S.; Ferreri, K.; Liu, C.-P.; Kuroda, Y.; Kandeel, F.; Mullen, Y.: Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. In: *Experimental hematology* 37 (2009) 5, S. 604–15.
- [36] English, K.; French, A.; Wood, K. J.: Mesenchymal stromal cells: facilitators of successful transplantation? In: *Cell Stem Cell* 7 (2010) 4, S. 431–42.
- [37] Li, Y.-P.; Paczesny, S.; Lauret, E.; Poirault, S.; Bordigoni, P.; Mekhloufi, F.; Hequet, O.; Bertrand, Y.; Ou-Yang, J.-P.; Stoltz, J.-F.; Miossec, P.; Eljaafari, A.: Human Mesenchymal Stem Cells License Adult CD34+ Hemopoietic Progenitor Cells to Differentiate into Regulatory Dendritic Cells through Activation of the Notch Pathway. In: *The Journal of Immunology* 180 (2008) 3, S. 1598–608.

- [38] Jiang, X.-X.; Zhang, Y.; Liu, B.; Zhang, S.-X.; Wu, Y.; Yu, X.-D.; Mao, N.: Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. In: *Blood* 105 (2005) 10, S. 4120–26.
- [39] English, K.; Barry, F. P.; Mahon, B. P.: Murine mesenchymal stem cells suppress dendritic cell migration, maturation and antigen presentation. In: *Immunology letters* 115 (2008) 1, S. 50–58.
- [40] Spaggiari, G. M.; Abdelrazik, H.; Becchetti, F.; Moretta, L.: MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. In: *Blood* 113 (2009) 26, S. 6576–83.
- [41] Zhang, B.; Liu, R.; Shi, D.; Liu, X.; Chen, Y.; Dou, X.; Zhu, X.; Lu, C.; Liang, W.; Liao, L.; Zenke, M.; Zhao, R. C. H.: Mesenchymal stem cells induce mature dendritic cells into a novel Jagged-2-dependent regulatory dendritic cell population. In: *Blood* 113 (2009) 1, S. 46–57.
- [42] Lüllmann-Rauch, R.: Taschenlehrbuch Histologie. 10 Tabellen, 2., komplett überarb. Aufl. Stuttgart [u.a.] 2006.
- [43] Spaggiari, G. M.; Capobianco, A.; Abdelrazik, H.; Becchetti, F.; Mingari, M. C.; Moretta, L.: Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. In: *Blood* 111 (2007) 3, S. 1327–33.
- [44] Ge, W.; Jiang, J.; Baroja, M. L.; Arp, J.; Zassoko, R.; Liu, W.; Bartholomew, A.; Garcia, B.; Wang, H.: Infusion of Mesenchymal Stem Cells and Rapamycin Synergize to Attenuate Alloimmune Responses and Promote Cardiac Allograft Tolerance. In: *American Journal of Transplantation* 9 (2009) 8, S. 1760–72.
- [45] Popp, F. C.; Eggenhofer, E.; Renner, P.; Slowik, P.; Lang, S. A.; Kaspar, H.; Geissler, E. K.; Piso, P.; Schlitt, H. J.; Dahlke, M. H.: Mesenchymal stem cells can induce long-term acceptance of solid organ allografts in synergy with low-dose mycophenolate. In: *Transplant Immunology* 20 (2008) 1-2, S. 55–60.
- [46] Eggenhofer, E.; Renner, P.; Soeder, Y.; Popp, F. C.; Hoogduijn, M. J.; Geissler, E. K.; Schlitt, H. J.; Dahlke, M. H.: Features of synergism between mesenchymal stem cells and immunosuppressive drugs in a murine heart transplantation model. In: *Transplant Immunology* 25 (2011) 2-3, S. 141–47.
- [47] Inoue, S.; Popp, F. C.; Koehl, G. E.; Piso, P.; Schlitt, H. J.; Geissler, E. K.; Dahlke, M. H.: Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells in a Rat Organ Transplant Model. In: *Transplantation* 81 (2006) 11, S. 1589–95.
- [48] Maccario, R.; Moretta, A.; Cometa, A.; Montagna, D.; Comoli, P.; Locatelli, F.; Podestà, M.; Frassoni, F.: Human mesenchymal stem cells and cyclosporin a exert a synergistic suppressive effect on in vitro activation of alloantigen-specific cytotoxic lymphocytes. In: *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 11 (2005) 12, S. 1031–32.
- [49] Roemeling-van Rhijn, M.; Weimar, W.; Hoogduijn, M. J.: Mesenchymal stem cells. In: *Current Opinion in Organ Transplantation* 17 (2012) 1, S. 55–62.

- [50] Franquesa, M.; Hoogduijn, M. J.; Reinders, M. E.; Eggenhofer, E.; Engela, A. U.; Mensah, F. K.; Torras, J.; Pileggi, A.; van Kooten, C.; Mahon, B.; Detry, O.; Popp, F. C.; Benseler, V.; Casiraghi, F.; Johnson, C.; Ancans, J.; Fillenberg, B.; delaRosa, O.; Aran, J. M.; Roemeling-van Rhijn, M.; Roemeling-vanRhijn, M.; Pinxteren, J.; Perico, N.; Gotti, E.; Christ, B.; Reading, J.; Introna, M.; Deans, R.; Shagidulin, M.; Farré, R.; Rambaldi, A.; Sanchez-Fueyo, A.; Obermajer, N.; Pulin, A.; Dor, Frank J M F; Portero-Sanchez, I.; Baan, C. C.; Rabelink, T. J.; Remuzzi, G.; Betjes, Michiel G H; Dahlke, M. H.; Grinyó, J. M.: Mesenchymal Stem Cells in Solid Organ Transplantation (MiSOT) Fourth Meeting: lessons learned from first clinical trials. In: Transplantation 96 (2013) 3, S. 234–38.
- [51] Le Blanc, K.; Frassoni, F.; Ball, L.; Locatelli, F.; Roelofs, H.; Lewis, I.; Lanino, E.; Sundberg, B.; Bernardo, M. E.; Remberger, M.; Dini, G.; Egeler, R. M.; Bacigalupo, A.; Fibbe, W.; Ringdén, O.: Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. In: The Lancet 371 (2008) 9624, S. 1579–86.
- [52] Tan, J.; Wu, W.; Xu, X.; Liao, L.; Zheng, F.; Messinger, S.; Sun, X.; Chen, J.; Yang, S.; Cai, J.; Gao, X.; Pileggi, A.; Ricordi, C.: Induction therapy with autologous mesenchymal stem cells in living-related kidney transplants: a randomized controlled trial. In: JAMA 307 (2012) 11, S. 1169–77.
- [53] Reinders, Marlies E J; de Fijter, Johan W; Roelofs, H.; Bajema, I. M.; de Vries, Dorottya K; Schaapherder, A. F.; Claas, Frans H J; van Miert, Paula P M C; Roelen, D. L.; van Kooten, C.; Fibbe, W. E.; Rabelink, T. J.: Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of allograft rejection after renal transplantation: results of a phase I study. In: Stem cells translational medicine 2 (2013) 2, S. 107–11.
- [54] Soeder, Y.; Loss, M.; Johnson, C. L.; Hutchinson, J. A.; Haarer, J.; Ahrens, N.; Offner, R.; Deans, R. J.; van Bokkelen, G.; Geissler, E. K.; Schlitt, H. J.; Dahlke, M. H.: First-in-Human Case Study: Multipotent Adult Progenitor Cells for Immunomodulation After Liver Transplantation. In: Stem cells translational medicine (2015).
- [55] Molendijk, I.; Bonsing, B. A.; Roelofs, H.; Peeters, Koen C M J; Wasser, Martin N J M; Dijkstra, G.; Janneke van der Woude, C; Veenendaal, R. A.; Zwaginga, J.-J.; Verspaget, H. W.; Fibbe, W. E.; van der Meulen-de Jong, Andrea E; Hommes, D. W.: Allogeneic Bone Marrow-derived Mesenchymal Stromal Cells Promote Healing of Refractory Perianal Fistulas in Patients with Crohn's Disease. In: Gastroenterology (2015).
- [56] Zappia, E.; Casazza, S.; Pedemonte, E.; Benvenuto, F.; Bonanni, I.; Gerdoni, E.; Giunti, D.; Ceravolo, A.; Cazzanti, F.; Frassoni, F.; Mancardi, G.; Uccelli, A.: Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. In: Blood 106 (2005) 5, S. 1755–61.
- [57] Kurtzberg, J.; Prockop, S.; Teira, P.; Bittencourt, H.; Lewis, V.; Chan, K. W.; Horn, B.; Yu, L.; Talano, J.-A.; Nemecek, E.; Mills, C. R.; Chaudhury, S.: Allogeneic human mesenchymal stem cell therapy (remestemcel-L, Prochymal) as a rescue agent for severe refractory acute graft-versus-host disease in pediatric patients.

- In: *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 20 (2014) 2, S. 229–35.
- [58] Kebriaei, P.; Isola, L.; Bahceci, E.; Holland, K.; Rowley, S.; McGuirk, J.; Devetten, M.; Jansen, J.; Herzig, R.; Schuster, M.; Monroy, R.; Uberti, J.: Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. In: *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 15 (2009) 7, S. 804–11.
- [59] Verbeek, R.: Generation of mesenchymal stem cells as a medicinal product in organ transplantation. In: *Current Opinion in Organ Transplantation* 18 (2013) 1, S. 65–70.
- [60] JAX Mice, The Jackson Laboratory: Genetically engineered and mutant mice. URL: <http://research.jax.org/grs/type/gemm/index.html>.
- [61] Eggenhofer, E.; Steinmann, J. F.; Renner, P.; Slowik, P.; Piso, P.; Geissler, E. K.; Schlitt, H. J.; Dahlke, M. H.; Popp, F. C.: Mesenchymal stem cells together with mycophenolate mofetil inhibit antigen presenting cell and T cell infiltration into allogeneic heart grafts. In: *Transplant Immunology* 24 (2011) 3, S. 157–63.
- [62] English, K.; Barry, F. P.; Field-Corbett, C. P.; Mahon, B. P.: IFN- γ and TNF- α differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. In: *Immunology letters* 110 (2007) 2, S. 91–100.
- [63] JAX Mice, The Jackson Laboratory: B6.129S7-Ifngr1tm1Agt/J. URL: <http://jaxmice.jax.org/strain/003288.html>.
- [64] Rassow, J.: *Biochemie. 50 Tabellen.* Stuttgart 2006.
- [65] SMITH, W. L.; MEADE, E. A.; DWITT, D. L.: Prostaglandin Endoperoxide Synthase Isozymes-1 and-2a. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 714 (1994) 1, S. 136–42.
- [66] Najar, M.; Raicevic, G.; Boufker, H. I.; Kazan, H. F.; Bruyn, C. D.; Meuleman, N.; Bron, D.; Tounougou, M.; Lagneaux, L.: Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: Combined comparison of adipose tissue, Wharton's Jelly and bone marrow sources. In: *Cellular Immunology* 264 (2010) 2, S. 171–79.
- [67] Harris, S. G.; Padilla, J.; Koumas, L.; Ray, D.; Phipps, R. P.: Prostaglandins as modulators of immunity. In: *Trends in Immunology* 23 (2002) 3, S. 144–50.
- [68] Brown, J. M.; Nemeth, K.; Kushnir-Sukhov, N. M.; Metcalfe, D. D.; Mezey, E.: Bone marrow stromal cells inhibit mast cell function via a COX2-dependent mechanism. In: *Clinical & Experimental Allergy* 41 (2011) 4, S. 526–34.
- [69] JAX Mice, The Jackson Laboratory: B6.129S6(FVB)-Ptgs2tm1.1Fun/J. URL: <http://jaxmice.jax.org/strain/008101.html>.
- [70] Friedenstein, A. J.; Chailakhjan, R. K.; Lalykina, K. S.: The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. In: *Cell and tissue kinetics* 3 (1970) 4, S. 393–403.
- [71] Crop, M. J.; Baan, C. C.; Korevaar, S. S.; IJzermans, J. N. M.; Pescatori, M.; Stubbs, A. P.; Van IJcken, W. F. J.; Dahlke, M. H.; Eggenhofer, E.; Weimar, W.; Hoogduijn, M. J.: Inflammatory conditions affect gene expression and function of

- human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. In: *Clinical & Experimental Immunology* 162 (2010) 3, S. 474–86.
- [72] Herrera, M. B.; Bussolati, B.; Bruno, S.; Morando, L.; Mauriello-Romanazzi, G.; Sanavio, F.; Stamenkovic, I.; Biancone, L.; Camussi, G.: Exogenous mesenchymal stem cells localize to the kidney by means of CD44 following acute tubular injury. In: *Kidney International* 72 (2007) 4, S. 430–41.
- [73] Bortolotti, F.; Ukovich, L.; Razban, V.; Martinelli, V.; Ruozi, G.; Pelos, B.; Dore, F.; Giacca, M.; Zacchigna, S.: In Vivo Therapeutic Potential of Mesenchymal Stromal Cells Depends on the Source and the Isolation Procedure. In: *Stem Cell Reports* 4 (2015) 3, S. 332–39.
- [74] Peister, A.: Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. In: *Blood* 103 (2004) 5, S. 1662–68.
- [75] Yañez, R.; Lamana, M. L.; García-Castro, J.; Colmenero, I.; Ramírez, M.; Bueren, J. A.: Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 24 (2006) 11, S. 2582–91.
- [76] Boxall, S. A.; Jones, E.: Markers for Characterization of Bone Marrow Multipotential Stromal Cells. In: *Stem Cells International* 2012 (2012) 5, S. 1–12.
- [77] Mitchell, J. B.; McIntosh, K.; Zvonic, S.; Garrett, S.; Floyd, Z. E.; Kloster, A.; Di Halvorsen, Y.; Storms, R. W.; Goh, B.; Kilroy, G.; Wu, X.; Gimble, J. M.: Immunophenotype of Human Adipose-Derived Cells: Temporal Changes in Stromal-Associated and Stem Cell-Associated Markers. In: *STEM CELLS* 24 (2006) 2, S. 376–85.
- [78] Puissant, B.; Barreau, C.; Bourin, P.; Clavel, C.; Corre, J.; Bousquet, C.; Taureau, C.; Cousin, B.; Abbal, M.; Laharrague, P.; Penicaud, L.; Casteilla, L.; Blancher, A.: Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. In: *British Journal of Haematology* 129 (2005) 1, S. 118–29.
- [79] Conget, P. A.; Minguell, J. J.: Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. In: *Journal of cellular physiology* 181 (1999) 1, S. 67–73.
- [80] Ren, G.; Su, J.; Zhang, L.; Zhao, X.; Ling, W.; L'huillie, A.; Zhang, J.; Lu, Y.; Roberts, A. I.; Ji, W.; Zhang, H.; Rabson, A. B.; Shi, Y.: Species Variation in the Mechanisms of Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression. In: *STEM CELLS* 27 (2009) 8, S. 1954–62.
- [81] Aggarwal, S.: Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. In: *Blood* 105 (2005) 4, S. 1815–22.